

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002 年1 月31 日 (31.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/08415 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/09, G01N 33/50, 33/15,
A01K 67/027, A61K 45/00, A61P 25/00, 1/04CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本
町四丁目1番8号 Saitama (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/06343

(72) 発明者; および

(22) 国際出願日: 2001 年7 月23 日 (23.07.2001)

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 野田昌晴 (NODA,
Masaharu) [JP/JP]; 〒444-0873 愛知県岡崎市竜美台二
丁目7番地9 Aichi (JP). 藤川顕寛 (FUJIKAWA, Akihiro)
[JP/JP]; 〒444-0008 愛知県岡崎市洞町字五位原79番
地2 サンハイム夢来1-D Aichi (JP).

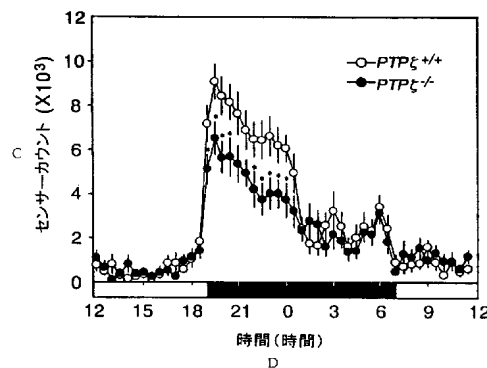
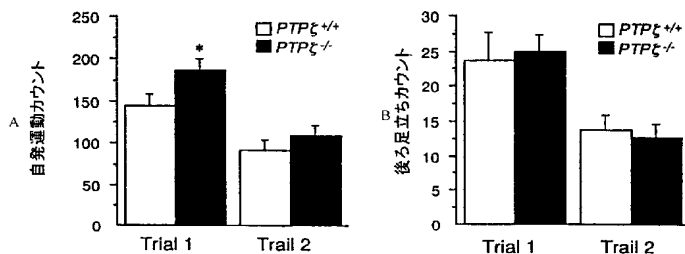
(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-223184 2000 年7 月24 日 (24.07.2000) JP(74) 代理人: 廣田雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052
東京都港区赤坂二丁目8番11号 第11赤坂葵ビル502
Tokyo (JP).(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY

(81) 指定国 (国内): CA, JP, US.

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF SCREENING PTP ζ ACTIVITY PROMOTER OR INHIBITOR(54) 発明の名称: PTP ζ 活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法

A... SPONTANEOUS MOVEMENT COUNT
B... COUNT OF STANDING ON HIND LEGS
C... SENSOR COUNT (X10³)
D... TIME (h)

(57) Abstract: A method of promoting a PTP ζ activity promoter or inhibitor, which is useful as a remedy for neutral monoamine nerve system disorder or gastric ulcer caused by *Helicobacter pylori* or pleiotrophin, by using the physiological functions of PTP ζ ; and a non-human model animal having a low sensitivity to excitants, pylori toxin or pleiotrophin. A PTP ζ activity promoter or inhibitor is screened by administering a test substance to a PTP ζ -knockout mouse and a wild type mouse and comparing and evaluating the PTP ζ activities of these animals (for example, occurrence of the central monoamine nerve system disorder, the extent of accommodation to new environment, responsiveness to stress, the extent of binding to pylori toxin or pleiotrophin).

[続葉有]



WO 02/08415 A1



(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (CH, DE, ES, FR, GB, IT, SE).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約:

P T P ㄥの生理的機能を利用する、中枢モノアミン神経系機能障害の治療薬や、ヘリコバクター・ピロリやプレイオトロフィンによる胃潰瘍の治療薬として有用なP T P ㄥ活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法や、興奮剤やピロリ毒素VacAやプレイオトロフィンに対して低感受性の非ヒトモデル動物を提供するものである。P T P ㄥノックアウトマウスと野生型マウスに被検物質を投与した際に、両者におけるP T P ㄥ活性の比較・評価、例えば、中枢モノアミン神経系の機能的障害の有無、新しい環境に対する慣れの程度、又はストレス応答性の比較・評価や、ピロリ毒素VacAやプレイオトロフィンとの結合の程度の比較・評価によりP T P ㄥ活性促進又は抑制物質をスクリーニングする。

明 細 書

P T P と 活 性 促 進 又 は 抑 制 物 質 の ス ク リ ー ニ ン グ 方 法

5 技 術 分 野

- 本発明は、遺伝子相同組換え技術により作出した受容体型プロテインチロシンホスファターゼ（P T P と / R P T P β ）の遺伝子を欠損させたマウス等の非ヒト動物を用いた、中枢モノアミン神経系の機能障害の治療薬や、ヘリコバクター・ピロリ等による胃潰瘍の治療薬のスクリーニングや、中枢興奮剤（依存性薬剤）に対して低感受性の非ヒトモデル動物やピロリ菌毒素 V a c A 等に対して低感受性の非ヒトモデル動物に関する。

背景技術

- 細胞に外界から刺激が加わると、細胞内のシグナル伝達経路が活性化され、細胞に増殖、分化、細胞死などが誘導される。細胞内蛋白質のチロシンリン酸化は、このシグナル伝達経路の種々の局面においてきわめて重要な役割を果たしており、蛋白質のチロシンリン酸化状態はチロシンキナーゼ（P T K）とチロシンホスファターゼ（P T P）両酵素の精巧なバランスによって常に動的平衡状態が保たれている。この蛋白チロシンリン酸化は、脳においては神経回路形成や神経伝達の効率の制御に関与すること（生体の科学 第 4 8 巻 第 6 号 5 3 4 - 5 3 8 頁 (1 9 9 7) ; 蛋白質 核酸 酵素 Vol.43, No.8, 1136-1143 (1998)) や、免疫系やその他の臓器においても、その機能の形成や維持に重要であることが知られている（蛋白質 核酸 酵素 Vol.43, No.8, 1131-1135 (1998)）。一方、これら蛋白チロシンリン酸化の異常は、神経回路形成の不良、記憶・学

習の阻害、異常なアポトーシス、腫瘍形成等に関与することが報告されている（蛋白質 核酸 酵素 Vol.43, No.8, 1186-1192(1998)）。

P T P は現在までに 8 0 種以上が同定され、ヒトではその遺伝子は 5 0 0 にも及ぶと推定されている。かかる P T P には、P T K と同様にレセプター型と非レセプター型が存在し、レセプター型は、細胞内に 2 個あるいは 1 個の酵素領域をもち、細胞外領域の特徴によりいくつかのグループに分類され、N 末端に炭酸脱水酵素領域を有する P T P とは中枢神経系に特異的なレセプター型チロシンホスファターゼとして同定され、本発明者らは P T P とがプレイオトロフィン、ミドカインといった増殖因子の受容体であることを報告している（J.Biol.Chem. 271, 21446-21452, 1996 ; J.Cell Biol. 142, 203-216, 1998 ; J. Biol.Chem. 274, 12471-12479, 1999）。また、P T P とは N - C A M を初めとするイムノグロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子と相互作用することが知られており、神経細胞の分化、移動、神経伝達において重要な機能を担うとされている。本発明者らは、既に P T P と遺伝子欠損マウスを作製し、P T P とが神経細胞とアストロサイトの両方に発現することを報告している（Neuroscience Letters 274, 135-138, 1998）。P T P と遺伝子欠損型マウスは正常に発育・繁殖し、形態学的にも大きな異常所見は同定されていない。しかし、P T P との生理的役割はほとんど分かっていないのが現状である。

最近、平山により P T P とが胃潰瘍の原因として有名なヘリコバクター・ピロリ菌が分泌する細胞外毒素、V a c A の受容体として機能している可能性が細胞株を使った実験系によって示された（J. Biol. Chem. 274, 36693-36699, 1999）。ピロリ菌毒素 V a c A は急性胃炎及び胃潰瘍患者の約 9 0 % で検出されており、ピロリ菌細胞外分泌毒素 V a c A を経口投与されたマウスは急性胃炎を引き起こすことが報告されている。

従来、その生理機能が不明であった P T P の生体内における役割が明確になると、P T P の生理機能に関連した疾病等の発症機構の解明、その治療薬の開発に繋がる知見や実験材料の提供が可能となる。本発明の課題は、P T P 遺伝子の欠損マウスを用いて同定された P T P の

5 生理的機能を利用することにより、中枢モノアミン神経系の機能障害の治療薬や、ヘリコバクター・ピロリ等による胃潰瘍の治療薬として有用な P T P 活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法や、中枢興奮剤（依存性薬剤）に対して低感受性の非ヒトモデル動物やピロリ菌毒素 V a c A 等に対して低感受性の非ヒトモデル動物を提供することにある。

- 10 前記のように、本発明者らが相同組換え技術を用いて既に作出しているが、このマウスは、2 系統のマウス種、すなわち 1 2 9 / S v と C 5 7 B L / 6 J の染色体が混ざった雑種であったため、他の遺伝子による影響を除外することが困難であった。そこで、P T P の生理的機能の解析に適するように、純系のマウスに十分な戻し交配（4 世代）を行い、
- 15 他の遺伝子の影響を排除した P T P 遺伝子欠損マウスを作製した。この P T P をコードする遺伝子 D N A の機能が染色体上で欠損したマウスと野生型マウスの比較解析により、正常に発育・繁殖しており、形態学的にも大きな異常所見が同定されていない P T P 欠損マウスが、中枢モノアミン代謝レベルの変化、覚醒剤（メタンフェタミン）に対する
- 20 感受性の低下、中脳－辺縁ドーパミン神経系の機能的障害、新しい環境に対する慣れの遅滞、ストレス応答性の増大などの中枢モノアミン神経系に機能的な障害を持っていることを初めて見出し、また、マウスの胃上皮細胞層に、ピロリ菌毒素 V a c A の受容体と考えられる P T P が発現していることを確認し、本発明を完成するに至った。

25

発明の開示

すなわち本発明は、プロテオグリカン型受容型プロテインチロシンホスファターゼ（PTP ϵ ）をコードする遺伝子DNAの機能が染色体上で欠損した非ヒト動物と、野生型の非ヒト動物とに、被検物質を投与し、これら非ヒト動物におけるPTP ϵ 活性を比較・評価することを特徴とするPTP ϵ 活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項1）や、PTP ϵ 活性の比較・評価が、中枢モノアミン神経系の機能の比較・評価であることを特徴とする請求項1記載のPTP ϵ 活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項2）や、中枢モノアミン神経系の機能の比較・評価が、中枢モノアミン代謝レベルの変化、覚醒剤に対する感受性、中脳－辺縁ドーパミン神経系の機能的障害の有無、新しい環境に対する慣れの程度、又はストレス応答性の比較・評価であることを特徴とする請求項2記載のPTP ϵ 活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項3）や、PTP ϵ 活性の比較・評価が、ピロリ菌毒素VacAとの結合の程度の比較・評価であることを特徴とする請求項1記載のPTP ϵ 活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項4）や、PTP ϵ 活性の比較・評価が、ヘパリン結合性分泌タンパク質プレイオトロフィンとの結合の程度の比較・評価であることを特徴とする請求項1記載のPTP ϵ 活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項5）や、PTP ϵ をコードする遺伝子DNAの機能が染色体上で欠損した非ヒト動物が、4世代以上の戻し交配により純化された非ヒト動物であることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載のPTP ϵ 活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項6）や、非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項1～6のいずれか記載のPTP ϵ 活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項7）や、請求項1～7のいずれか記載のプロテオグリカン型受容型プロテインチロシンホスファターゼ（PTP ϵ ）活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法

によって得られる P T P と 活性促進又は抑制物質（請求項 8）や、P T P と 活性促進又は抑制物質が、P T P と とピロリ菌毒素 V a c A との間の結合阻害物質である請求項 8 記載の P T P と 活性促進又は抑制物質（請求項 9）や、P T P と 活性促進又は抑制物質が、P T P と とヘパリン結合性分泌タンパク質プレイオトロフィンとの間の結合阻害物質である請求項 8 記載の P T P と 活性促進又は抑制物質（請求項 10）や、請求項 8 記載のプロテオグリカン型受容型プロテインチロシンホスファターゼ（P T P と）活性促進又は抑制物質を有効成分として含有する中枢モノアミン神経系機能障害の治療薬（請求項 11）や、請求項 8 又は 9 記載のプロテオグリカン型受容型プロテインチロシンホスファターゼ（P T P と）活性抑制物質を有効成分として含有するヘリコバクター・ピロリによる胃潰瘍又は胃炎の治療薬（請求項 12）や、請求項 8 又は 10 記載のプロテオグリカン型受容型プロテインチロシンホスファターゼ（P T P と）活性抑制物質を有効成分として含有するプレイオトロフィンによる胃潰瘍又は胃炎の治療薬（請求項 13）に関する。

また本発明は、プロテオグリカン型受容型プロテインチロシンホスファターゼ（P T P と）をコードする遺伝子 D N A の機能が染色体上で欠損した、中枢興奮剤（依存性薬剤）に対して低感受性の非ヒトモデル動物（請求項 14）や、覚醒剤に対して低感受性である請求項 14 記載の非ヒトモデル動物（請求項 15）や、P T P と をコードする遺伝子 D N A の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物が、4 世代以上の戻し交配により純化された非ヒト動物であることを特徴とする請求項 14 又は 15 記載の非ヒトモデル動物（請求項 16）や、非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項 14 ～ 16 のいずれか記載の非ヒトモデル動物（請求項 17）や、プロテオグリカン型受容型プロテインチロシンホスファターゼ（P T P と）をコードする遺伝子 D N A の機能が染色体上で

- 欠損した、ピロリ菌毒素 V a c A に対して低感受性の非ヒトモデル動物（請求項 1 8）や、プロテオグリカン型受容型プロテインチロシンホスファターゼ（P T P ㄱ）をコードする遺伝子 D N A の機能が染色体上で欠損した、ヘパリン結合性分泌タンパク質プレイオトロフィンに対して
- 5 低感受性の非ヒトモデル動物（請求項 1 9）や、P T P ㄱをコードする遺伝子 D N A の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物が、4 世代以上の戻し交配により純化された非ヒト動物であることを特徴とする請求項 1 8 又は 1 9 記載の非ヒトモデル動物（請求項 2 0）や、非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項 1 8 ～ 2 0 のいずれか記載の非ヒト
- 10 モデル動物（請求項 2 1）に関する。

図面の簡単な説明

- 第 1 図は、オープンフィールド試験及び概日リズムにおける P T P ㄱ欠損マウスの性質表現型を調べた結果を示す図である。
- 15 第 2 図は、P T P ㄱ欠損マウス脳におけるモノアミンの代謝変化を示す図である。
- 第 3 図は、P T P ㄱ欠損マウスにおけるドーパミン神経系の免疫組織化学の結果を調べた結果を示す図である。
- 第 4 図は、P T P ㄱ欠損マウスにおけるメタンフェタミン及び G B R
- 20 1 2 9 9 0 9 に対する自発運動応答性の低下を示す図である。
- 第 5 図は、P T P ㄱ欠損マウスの側坐核における D A 神経伝達の異常を示す図である。
- 第 6 図は、成体マウス脳のドーパミン神経系における P T P ㄱの発現特性を調べた結果を示す図である。
- 25 第 7 図は、P T P ㄱ欠損マウスにおけるストレス及び恐怖行動の結果を示す図である。

第 8 図は、野生型マウスと P T P と欠損マウスの新規物体に対する探索行動の結果を示す図である。

第 9 図は、野生型マウスと P T P と欠損マウスの胃上皮細胞層における P T P との発現を調べた結果を示す図である。

5 第 10 図は、マウス胃上皮細胞層における P T P との転写 (R T - P C R) 及び発現 (ウエスタンブロット) を調べた結果を示す図である。

第 11 図は、ピロリ菌毒素 V a c A を経口投与した野生型マウスと P T P と欠損マウスにおける胃潰瘍形成の結果を示す図である。

10 第 12 図は、V a c A 刺激による P T P との基質分子 G I T 1 のチロシンリン酸化を調べた結果を示す図である。

第 13 図は、プレイオトロフィン投与によるマウス胃上皮における胃粘膜障害の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

15 本発明の P T P と活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法としては、P T P とをコードする遺伝子 D N A の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物と、野生型の非ヒト動物とに、被検物質を投与し、これら非ヒト動物における P T P と活性を比較・評価 (解析) するスクリーニング方法であれば特に制限されるものではなく、P T P とをコードする遺伝子 D N A の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物とは、例えば P T P とをコードする非ヒト動物の内在性遺伝子の一部もしくは全部が破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性化され、野生型において P T P とを発現する機能を失なった非ヒト動物等をいう。また本発明における非ヒト動物としては、マウス、ラット、モルモット等の齧歯目動物を具体的に挙げるができるが、これらに限定されるものではない。以下、

20 P T P とをコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物の作

25

製方法を、P T P と遺伝子機能が染色体上で欠損したマウスを例にとつて説明する。

P T P と遺伝子機能が染色体上で欠損したマウス、すなわちP T P とノックアウトマウスは、本発明者らの前掲の文献（Neuroscience Letters 274, 135-138, 1998）に記載する方法等によって作製することができる。具体的には、マウス遺伝子ライブラリーからP C R等の方法により得られた遺伝子断片を用いて、P T P と遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされたP T P と遺伝子の一部又は全部を、例えばL a c - Z 遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等マーカー遺伝子で置換し、必要に応じて、5' 末端側にジフテリアトキシンAフラグメント（D T - A）遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ（H S V - t k）遺伝子等の遺伝子を導入してターゲティングベクターを作製し、この作製されたターゲティングベクターを線状化し、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション（電気穿孔）法等によってE S細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、X-g a l による染色あるいはG 4 1 8 やガンシクロピア（G A N C）等の抗生物質に抵抗性を示すE S細胞を選択する。この選択されたE S細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。

上記組換えE S細胞をマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体マウスを得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせることによって、P T P とノックアウトマウスを得ることができる。また、得られたノックアウトマウスを純系マウスに戻し交配することにより、P T P と以外の遺伝的背景が均一なP T P とノックアウトマウスを得ることができる。かかる純系マウスとしてはどのような

純系マウスを用いてもよいが、例えばC57BL/6Jを具体的に挙げることができる。そして、かかるPTPとノックアウトマウスにPTPとが生起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスの尾端の一部からDNAを分離してサザンブロット法等により調べたり、このマウスの神経細胞等からRNAを単離してノーザンブロット法等により調べたり、またこのマウスのPTPとの発現をウエスタンブロット法等により調べる方法がある。

本発明におけるPTPと活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法としては、PTPとをコードする遺伝子の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物、例えば、PTPとノックアウトマウスと野生型マウス、好ましくは同腹の野生型マウスにそれぞれ被検物質を投与し、該ノックアウトマウスにおけるPTPと活性と野生型マウスにおけるPTPと活性とを比較・評価する方法を挙げることができる。また、上記PTPと活性の比較・評価としては、実施例に詳しく説明されている、中枢モノアミン代謝レベルの変化、覚醒剤に対する感受性、中脳－辺縁ドーパミン神経系の機能的障害の有無、新しい環境に対する慣れの程度、又はストレス応答性の比較・評価等の中枢モノアミン神経系の機能の比較・評価や、ピロリ菌毒素VacAとの結合の程度、特にPTPととピロリ菌毒素VacAとの間の結合の阻害の程度の比較・評価や、ヘパリン結合性分泌タンパク質プレイオトロフィンとの結合の程度、特にPTPととヘパリン結合性分泌タンパク質プレイオトロフィンとの間の結合の阻害の程度の比較・評価を挙げることができる。

PTPと活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法における被検物質の投与方法としては、経口投与、静脈投与等特に制限されるものでなく、被検物質を投与後、PTPとノックアウトマウスと野生型マウスにおけるPTPと活性を測定し、その比較・評価が行われる。モノアミン

神経系が関係する脳高次機能は多岐にわたっており、その機能的障害や変性は多様な病態に結びつくことが知られていることから、P T P とノックアウトマウスにおける中枢モノアミン神経系の機能障害が野生型マウスの機能と同程度まで改善・治癒された場合、かかる被検物質はP T P とのアゴニストなどのP T P と活性促進物質であり、かかるP T P と活性促進物質は中枢モノアミン神経系機能障害の治療薬、例えば重篤な神経変性疾患であるパーキンソン病やハンチントン舞踏病、自閉症等に加えて、躁鬱病、多動症、薬物依存症などの神経性疾患の新規な治療薬として期待できる。また、中枢モノアミン神経系の機能の比較・評価により見出されたP T P と活性抑制物質は、以下に述べるピロリ菌毒素V a c Aやヘパリン結合性分泌タンパク質プレイオトロフィンによる胃潰瘍や胃炎の治療薬として有用である可能性がある。

胃潰瘍の原因として有名なヘリコバクター・ピロリ菌が分泌する細胞外毒素、V a c Aは急性胃炎及び胃潰瘍患者の約90%以上で検出されており、ピロリ菌細胞外分泌毒素V a c Aを経口投与されたマウスは急性胃炎を引き起こすことが知られていることから、野生型マウスにおけるピロリ菌毒素V a c Aとの結合の程度がP T P とノックアウトマウスのそれと同程度まで改善された場合、かかる被検物質はP T P とのアンタゴニストや、P T P ととピロリ菌毒素V a c Aとの間の結合阻害物質などのP T P と活性抑制物質であり、かかるP T P と活性抑制物質・P T P と活性阻害剤は新規な胃潰瘍や胃炎の治療薬として期待できる。上記、ピロリ菌毒素V a c Aとの結合の程度の比較・評価により見出されたP T P と活性促進物質は、中枢モノアミン神経系機能障害の治療薬として有用である可能性がある。P T P ととの結合により胃潰瘍を起こすことが本発明者らにより初めて明らかとなったプレイオトロフィンの胃潰瘍形成における関与は、これまで全く知られていない知見であり、P

TPと欠損マウスがプレイオトロフィンによる胃潰瘍形成の陰性コントロールである。

また、18 kDのヘパリン結合性分泌タンパク質プレイオトロフィンは、本発明者らにより、PTPとの結合により胃潰瘍を起こすことが
5 初めて明らかとなったことから、野生型マウスにおけるプレイオトロフィンとの結合の程度がPTPとノックアウトマウスのそれと同程度まで改善された場合、かかる被検物質はPTPとのアンタゴニストや、PTPとプレイオトロフィンとの間の結合阻害物質などのPTPと活性抑制物質であり、かかるPTPと活性抑制物質・PTPと活性阻害剤は新
10 規な胃潰瘍や胃炎の治療薬として期待できる。上記、プレイオトロフィンとの結合の程度の比較・評価により見出されたPTPと活性促進物質は、中枢モノアミン神経系機能障害の治療薬として有用である可能性がある。

本発明の興奮剤（依存性薬剤）に対して低感受性の非ヒトモデル動物
15 としては、プロテオグリカン型受容型プロテインチロシンホスファターゼ（PTP）をコードする遺伝子DNAの機能が染色体上で欠損した、PTPとノックアウトマウス等であれば特に制限されるものではないが、4世代以上の戻し交配により純化したノックアウトマウスが好ましい。
PTPとノックアウトマウスの有用性、特に興奮剤（依存性薬剤）に対して低感受性であることは全く知られておらず、かかる有用性は本発明
20 により初めて明らかにされたものである。またここで、低感受性とは野生型非ヒト動物に比較して興奮剤に対する応答の程度が低いものをいい、本発明の興奮剤（依存性薬剤）に対して低感受性の非ヒトモデル動物には、感受性の程度が少し低いものから全く応答しない不応答性のものまで
25 含まれる。また、上記興奮剤（依存性薬剤）としては、覚醒剤メタンフェタミン及び同様の作用を有するアンフェタミン、ドーパミントラン

スポーツ阻害剤 G B R 1 2 9 0 9 と同様な作用を有するコカイン及び大麻類、セロトニン遊離剤の p - クロローアンフェタミンと同様な作用を有する L S D、fluoxetine、fluoxetine、paroxetine、sertraline 等の抗うつ病剤として用いられるセロトニン再取込み選択的阻害剤（S S R I）などを挙げることができる。本発明の中枢興奮剤（依存性薬剤）に対して低感受性の非ヒトモデル動物は、覚醒剤（依存性薬剤）に対して低感受性であるほか、以下の実施例で詳細に述べられているように、中枢モノアミン代謝レベルの変化、中脳－辺縁ドーパミン神経系の機能的障害、新しい環境に対する慣れの遅滞、ストレス応答性の増大など、異常な神経学的性状を備えていることから、中枢興奮剤（依存性薬剤）に対する応答のメカニズムなど中枢神経系におけるシグナル伝達機構の解明に有用な実験モデル動物となるばかりか、上記のように、薬物中毒や神経性疾患の新規な治療薬のスクリーニングにも用いることができる。

本発明のピロリ菌毒素 V a c A やヘパリン結合性分泌タンパク質プレイオトロフィンに対して低感受性の非ヒトモデル動物としては、プロテオグリカン型受容型プロテインチロシンホスファターゼ（P T P ㇿ）をコードする遺伝子 D N A の機能が染色体上で欠損した、P T P ㇿノックアウトマウス等であれば特に制限されるものではないが、4 世代以上の戻し交配により純化したノックアウトマウスが好ましい。P T P ㇿノックアウトマウスの有用性、特にピロリ菌毒素 V a c A やヘパリン結合性分泌タンパク質プレイオトロフィンに対して低感受性であることは全く知られておらず、かかる有用性は本発明により初めて明らかにされたものである。本発明のピロリ菌毒素 V a c A やヘパリン結合性分泌タンパク質プレイオトロフィンに対して低感受性の非ヒトモデル動物は、ピロリ菌毒素 V a c A やヘパリン結合性分泌タンパク質プレイオトロフィンによる胃潰瘍の発生メカニズムの解明に有用な実験モデル動物となるば

かりか、上記のように、新規な胃潰瘍の治療薬のスクリーニングにネガティブコントロールとして有利に用いることができる。

以下、本発明を実施例により詳細の説明するが、本発明はかかる実施例により制限されるものではない。

5 実施例 1（中枢ドパミン神経系及びモノアミン神経系における P T P との生理的役割と P T P と欠損マウスの有用性）

P T P とは中枢神経系に大量に発現しているが、その神経生理学的な役割はわかっていない。そこで、P T P と遺伝子欠損マウスと野生型マウスを行動学及び神経薬理学的に比較・解析することで、P T P と分子の
10 脳高次機能における重要性を個体レベルで調べた。

実施例 1－1 [方法]

（A－1 動物）

P T P と欠損マウスは、本発明者らの前掲の文献（Neuroscience Letters 274, 135-138, 1998）記載の方法で作製した。変異体マウスに、
15 P T P と遺伝子のエキソン 1 の翻訳開始コドンの直後に L a c Z 遺伝子を挿入し、従って、P T P と遺伝子の発現調節ユニットのコントロールのもと、L a c Z 遺伝子が発現する。本実験において、ノックアウトマウスを、同系交配 C 5 7 B L / 6 J 系と 4 世代戻し交配し、同腹子のオスを生後 2～5 ヶ月で使用した。25℃の動物管理設備内、明暗 12 /
20 12 時間の周期で動物を保持し、無制限に餌と水を与えた。動物管理は、制度化されたガイドラインに基づき行った。

（A－2 行動実験）

午前 7：00～午後 7：00 の間の明周期において行動試験を行った。

A－2－1

25 オープンフィールド試験において、格子状 25 区分に同等に区切った灰色円形フィールド（内部直径 80 cm、高さ 40 cm）中央にマウス

を配置した。5分間に跨いだ格子の区切り線の数を読み、これを自発運動として測定した。

A-2-2

赤外線受動センサーシステム（A Bシステム24A、Neuroscience, inc.製）を用いて日周期運動性を測定した。無制限に餌と水を与えながら7日間動物を個別に収容した通常サイズのマウスケージ（30×20×13cm）の上部にセンサーを取り付け測定した。最後の3日間の測定データを用いて解析・評価を行った。

A-2-3

10 強制遊泳試験においては、深さ8cmまで22℃の水を入れた円筒状容器（直径8cm、高さ20cm）中でマウスを15分間強制的に2日間連続で泳がせた。赤外線モニター装置（SCANET MV-10、Toyo Sangyo Co. Ltd 製）を用いて5分ごとに運動量を測定した。

A-2-4

15 高架式十字迷路は、中央エリア（6×6cm）及び4本のアームを有し、床から50cmの高さに設置されている。2つの「暗路」は壁（30cm）の覆いがあり、もう2つの「明路」には低い縁（1cm）が設けられている。マウスを迷路の中央に配置し、ほぼ暗い状態（約80ルクス）で5分間に明路及び暗路に入った回数及びその中での滞在時間を
20 測定した。

A-2-5

オープンフィールドの容器とプラスチック製の立方体（一片＝9cm）を用いて、新規物体に対する探索行動の評価を行った。試験前日、マウスを10分間ほどオープンフィールド内に入れ、事前にその環境に慣ら
25 しておき、試験当日、何も置いていないフィールド内にマウスを入れて9分間の観察を行い、次に、フィールド中央の領域の中心点に立方体型

のプラスチック製積み木を静かに置き、さらに9分間の観察を行った。
なお、観察の結果については、マウスがオープンフィールドの区切り線
を横切った回数をカウントし、移動度として評価し、フィールド全域及
び、フィールド中央の一定領域の区画線に対する横切り回数をそれぞれ
5 評価した。

(A-3 薬理実験)

透明アクリルチャンバー(40×40×40 cm)内で電磁気運動モ
ニターシステム(センサーユニット0603、スキャナー1099、
Panlab製)を用いて動物の動きを測定し、自発運動における精神刺激薬
10 剤の作用を測定した。薬を投与する前に、動物は少なくとも90分間測
定環境に馴らされた。その後、動物に覚醒剤メタンフェタミン(METH
H)(1 mg/kg, s.c.)、GBR12909(2 mg/kg, i.
p.)、アポモルヒネ(1 mg/kg, s.c.)、又はp-クロロアン
フェタミン(2 mg/kg, i.p.)を与え、また、コントロールには
15 生理食塩水を与え、その後60分間自発運動を観察した。

(A-4-1 ドーパミン及びその代謝産物の定量化)

氷上で脳組織を切除し、10 mM HClO₄、0.1 mM sodium
pyrosulfite、20 μM EDTA・2Na及び(±)イソプロテレノール
10 pg/mlを内部標準として含む溶液中で超音波処理により抽出し、
20 15,000 rpmで10分間遠心分離した。上清中のドーパミン及び
その代謝産物を、電気化学検知器を用いた自動HPLC(Coulochem II,
MC medical, inc.製)により次の条件で測定した。MCM C-18カラ
ム(4.6×150 mm、MC medical, inc.製)、3.1%アセトニトリ
ル、7.6%メタノール、4.4 mM 1-スルホン酸ヘプタンナトリウ
ム、及び0.1 mM EDTA・2Naを含む50 mM酢酸-クエン酸緩
25 衝液(pH 3.0)を用い、37℃に保ったカラムチャンバー内で流速

1. 0 ml / 分で分離した。作用電極は、+ 450 mV にセットした。
(A-4-2 インビボマイクロダイアリシス試験)

マウスにペントバルビタールナトリウム (80 mg / kg i. p.)
で麻酔をかけ、定位装置内に固定した。頭蓋骨にドリルで穴を開け、側
5 坐核 (NAC) 内に大脳内ガイドカニューレ (CMA 11、CMA /
Microdialysis AB 製) を挿入し、歯科用セメントで固定した。野生型及
び PTP と欠損マウスにおけるガイドカニューレの移植定位は、頭蓋
プレグマ表面から前側 + 1.1 mm、腹側 + 3.6 mm、側側 + 1.0 mm
であった。手術後 24 時間において、自発運動チャンバー (30 × 3
10 0 cm) に設置された赤外線モニター装置 (SCANET LC-10、
Toyo Sangyo Co. Ltd 製) を設けた平衡レバーアームにマウスを拘束し
た。ガイドカニューレを通して透析プローブ (膜長 1 mm、外部直径 0.
24 mm、cuprophane CUP 11、CMA/Microdialysis AB 製) を挿
入し、pH 7.4 の人工大脳脊髄液 (ACSF) (145.0 NaCl、
15 2.7 KCl、1.2 CaCl₂、1.0 MgCl₂、及び 2.0 NaH₂PO₄、
いずれも mM) を用いて流速 2 µl / 分で灌流した。自由に動
いている動物から 20 分ごとに灌流水を、0.4 M HClO₄ 20 µl
を含むチューブ内 (CMA 170) に採取した。上記のように HPLC
-ECD を用いてサンプルを回収し分析した。変更点として、カラムは
20 MCM C-18 (4.6 × 150 mm) を用い、バッファーは 75 mM
NaH₂PO₄、1.7 mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウム塩、0.
1 mM トリエチルアミン、25 µM EDTA・2Na 及び 10% アセト
ニトリルを含み、30℃ で、流速は 0.55 ml / 分とした。電極は、
+ 320 mV にセットした。METH の投与 (1 mg / kg s. c.)、
25 又は高 K⁺ 溶液 (47.7 NaCl、100.0 KCl、及び 1.2 CaCl₂、
1.0 MgCl₂、及び 2.0 NaH₂PO₄、いずれも mM、

pH 7.4) の局所注入は定常状態になった後、微細透析プローブを通して行った。

(A-5 免疫組織化学)

5 ペントバルビトールナトリウムでマウスに麻酔をかけ、4%パラホルムアルデヒド溶液を灌流固定した。脳を切除し、30%スクロースを含む4℃の0.1Mリン酸バッファー(PB)中で一晩インキュベートした。クリオスタット上で、前記脳を40μm切片に切断した。前記切片を、3% H_2O_2 及び0.05%NP-40を含む20mM PB食塩水(PBS)で30分間処理し、PBS中10%正常ヤギ血清及び0.05% TritonX-100 でブロックした。その後、ウサギ抗チロシンヒドロキシラーゼ(1:1000)(AB152、Chemicon international Inc. 製)を用いて前記切片を一晩インキュベートした。3,3ジアミノベンジジン(DAB)及び H_2O_2 を基質として用いるとともに、ABCペルオキシダーゼキット(Vectors laboratories, Inc.)を製造者による使用
10 説明書に基づき用い、特定抗体の結合を検出した。免疫組織化学分析前に、ヘテロ接合変異体マウスから得た組織切片をX-gal染色し、PTPと遺伝子発現を反映するβ-ガラクトシダーゼを検知した
15 (Neuroscience letters 274, 135-138, 1998)。

(A-6 ドーパミン取り込み試験)

20 以下の方法によりドーパミン(DA)取り込み量を測定した。線条体シナプトソーム(striatal)組織プール(3個体/プール)を、テフロンガラスホモジナイザーを用い100 volume (v/w)の0.32Mスクロース中で均質化し、12,000 rpmで10分間遠心分離した。未処理シナプトソームペレットを、30mg/ml(元湿重量)の濃度の
25 0.32Mスクロース中で再懸濁し、各30μlの部分に分割した。 $[^3H]$ DAの濃度を増しながら(最終1~10nM、88.5Ci/nm

○ 1、Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.製)、Krebs-Ringer リン酸バッファー $270 \mu\text{l}$ と共に各部分に加えた。3 分間、 30°C でのインキュベーション後、Whatman GF/C ガラスフィルターを用いて濾過し、
5 フィルターを 3 回濯ぎ、リキッドシンチレーション計数器を用いて 50 % 効率で測定した。 $10 \mu\text{M}$ GBR 12909 存在下において、ブランク値を測定した。

(A-7 単一細胞からの cDNA 合成)

前報の方法 (J. Neuroscience 18, 3124-3137, 1998) でシングルセル
10 からの cDNA を作製した。断頭後速やかにマウス脳を切除し、低 Ca^{2+} HEPES バッファー食塩水 (140.0 Naイセチオン酸塩 、 2.0 KCl 、 4.0 MgCl_2 、 0.1 CaCl_2 、 23.0 グルコース 、及び 15.0 HEPES 、いずれも mM) 中で、 $400 \mu\text{m}$ の厚さの頭頂中脳切片になるようにマイクロスライサーで切断した。前記切片を、
15 NaHCO_3 バッファー食塩水 (126.0 NaCl 、 2.5 KCl 、 2.0 MgCl_2 、 26.0 NaHCO_3 、 $1.25 \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ 、 1.0 ピルビン酸 、 0.2 アスコルビン酸 、 0.1 N^G -ニトロ-L-アルギニン、 1.0 キヌレイン酸 、及び 10.0 グルコース を有し、 NaOH で $\text{pH } 7.4$ に調整、いずれも mM) 中室温で 1 時間保存した。腹側
20 被蓋領域及び黒質を、低 Ca^{2+} 中に取り出し、酸素処理セルスターチャンバー (Cell-stir chamber; Wheaton, Inc. 製) 内において、 35°C の HEPES バッファー HBS 中 1 mg/ml プロナーゼで 30 分間処理した。この組織を、低 Ca^{2+} HEPES バッファー食塩水で 3 回濯ぎ、パステュールピペットで、繰り返しピペッティングすることにより細胞
25 を分離した。細胞懸濁液を、顕微鏡上の、HEPES バッファー HBS が入った 35 mm ルクスペトリ皿に注ぎ入れた。細胞が安定した後、

溶液をH E P E Sバッファーに変更した。ジエチルピロ炭酸塩（D E P C）処理水で満たした電極ピペット中に細胞内容物を吸引した。該内容物を直ちに回収し、D E P C処理水（H₂O）5 μ l、R N A s i n（28,000 U / m l、Promega corporation 製）0.5 μ l、dithiothreitol（D T T、0.1 M）0.5 μ l、及びランダムヘキサマープライマー0.1 μ l（50 n g / μ l）混合物中に加えた。該混合物を70℃で10分間熱した後、速やかに5分間氷冷却した。細胞m R N AにSuperscript II reverse transcriptase（200 U / μ l）（Life technologies）1 μ l、5×反応バッファー4 μ l、及び10 mM d N T P 1 μ lを加えることによりc D N Aを合成した。総量20 μ lで、42℃で50分間反応後、70℃で15分間の処理を行った。

（A-8 マルチプレックス及びネスティド（nested）P C R）

前報の方法（EMBO J. 18, 833-846, 1999）を改良し、マルチプレックス及びネスティドP C Rを行った。単細胞由来のc D N Aを37℃のR N a s e（1 μ l、2 U / μ l）で20分間処理した。マーカー遺伝子のプライマーセットである、チロシンヒドロキシラーゼ（T H、GenBank アクセSSIONS番号M 6 9 2 0 0）、グルタミン酸ジカルボキシラーゼ67（G A D 6 7、アクセSSIONS番号Z 4 9 9 7 6）、膠酸繊維タンパク質（glial acidic fiber protein; G F A P、アクセSSIONS番号K 0 1 3 4 7）については、Liss らの文献（EMBO J. 18, 833-846, 1999）に報告され、P T P とを増幅するプライマーセット（アクセス番号U 0 9 3 5 7）は本実験で作製された。T H、G A D 6 7、G F A P、及びP T P とのc D N Aを、ファーストプライマー混合物（5' ~ 3' のP T P とに対し、センス[配列番号1]: G G T C C A C T G A A G T C C A C A G C ; ポジション5512 ~ 5531、アンチセンス [配列番号2]: T C T A G T A C A A T G T A T G T

G C C C G ; ポジション 5 9 4 8 ~ 5 9 2 7) を用いたマルチプレックス P C R により 1 本のチューブ内で同時に増幅した。最初のマルチプレックス P C R は、シングルセル c D N A 5 μ l 、各プライマー 2 0 p m o l 、 d N T P 2 0 0 μ M 、 1 0 \times P C R バッファー 2 μ l 、 E X -

5 T a q (Takara Shuzo co., ltd. 製) 1 U を含み、最終量 2 0 μ l になるように行った。P C R は、サーマルサイクラー M P (Takara) を使い、以下の条件で行った。9 4 $^{\circ}$ C で 5 分間の後、9 5 $^{\circ}$ C で 3 0 秒間、6 2 $^{\circ}$ C で 3 秒間、7 2 $^{\circ}$ C で 2 分間の条件で 2 5 サイクル行い、7 2 $^{\circ}$ C で 5 分間の処理を行った。4 つの個別反応について、最初の P C R 生成物 0 . 1

10 μ l 、 d N T P 2 0 0 μ M 、 1 0 \times P C R バッファー 2 μ l 、 E X - T a q 0 . 5 U 、及び各プライマーペア 1 0 p m o l (P T P ζ に対する、センス [配列番号 3] : C G G G A G C T T C C T G G T C A A C C A G ; ポジション 5 6 5 5 ~ 5 6 7 7 、アンチセンス [配列番号 4] : A G C A C G G G T A G G G A G T A C T C ; ポジション 5 8 7

15 3 ~ 5 8 2 4) を含み最終量 2 0 μ l になるように、ネステッド P C R を行った。P C R 生成物のうち 5 μ l 部分を、3 % Nusive 3 : 1 アガロースゲル (F M C BioProducts, Rockland) 上で電気泳動分離し、臭化エチジウム染色で明視化し、増幅断片の存在及びそのサイズについて調査した。P C R により生成した 8 断片の予想サイズ (b p) は、1 8 9 (P

20 T P ζ) 、 3 7 7 (T H) 、 5 1 7 (G F A P) 、及び 7 0 2 (G A D 6 7) であった。P T P ζ のプライマーは、P T P ζ - A 及び - B イソフォームの配列中にのみ存在し、phosphacan (J. Biochem.(Tokyo), 123, 458-467, 1998) としても知られている P T P ζ - S には存在しない細胞内ホスファターゼドメイン D 1 のみを増幅することができる。

25 実施例 1 - 2 [結果]

(P T P ζ 欠損マウスの行動学的な表現型)

P T P と欠損マウスの行動学的な表現型を明らかにするために、オープンフィールド試験によって行動観察を行った（前記方法 A-1 及び A-2-1）。野生型マウス（P T P と $+/+$ 、 $n = 10$ ）及び P T P と欠損マウス（P T P と $-/-$ 、 $n = 12$ ）における（A）自発運動及び（B）

- 5 後ろ足立ちについて、オープンフィールド試験により連続 2 日間測定した結果が、それぞれ図 1 A 及び図 1 B に示されている。図中のデータは、
平均値 \pm S E M（* $p < 0.05$ ）として示されている。その結果、初日のオープンフィールドにおいて、P T P と欠損マウスは野生型マウスに
10 比べてより多くの自発運動を示し、有意に高い運動性を示すといえるが、
24 時間後のテストでは、その変化が消失していた（図 1 A）。一方、探索行動の後ろ足立ち（rearing）値に有意な変化は認められなかった（図 1 B）。P T P と欠損マウスは新規環境に対する自発運動の応答性が亢進していることが示された。

- ホームケージ条件における、連日の自発運動を調べた（前記方法 A-2-2）。マウスを、個別に 7 日間飼育し、最後の 3 日間において赤外線
15 受動センサーにより自発的運動を分析した（P T P と $+/+$ 、 $n = 14$ 及び P T P と $-/-$ 、 $n = 14$ ）。結果を図 1 C に示す。図中のデータは各 30 分間隔ごとの平均値 \pm 毎 S E M データを示す（* $p < 0.05$ ）。P T P と $-/-$ マウスでは、野生型と比べ早暗期中において概日運動の最高点が著しく低下し、活動リズムは正常であるが、消灯直後（19 時から
20 24 時）の活動ピークが野生型マウスに比べて有意に低いことが示された。

（脳内モノアミン代謝の異常）

- 自発運動やサーカディアンリズムは、脳内モノアミン神経と深く関係
25 することが知られている。そこで、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）と電気化学検出器（E C D）により、脳内のドパミン（D A）、ノルエピ

ネフリン (NE)、セロトニン (5-HT) とそれらの代謝産物 (DA 代謝物 DOPAC, HVA; NE 代謝物 MHPG; 5-HT 代謝物 5-HIAA) の組織内含量を測定した (前記方法 A-4-1)。結果を図 2 に示す。図中のデータは、PTP と +/+ マウス (n = 7) 及び PTP と -/- マウス (n = 7) からの平均値 ± SEM として示されている (*p < 0.05、**p < 0.01)。その結果、PTP と欠損マウスの脳内ではモノアミン代謝が明らかに異常であることが判明した。DA の組織含量は、両遺伝子型においてほぼ同様であった (A)。しかし、DOPAC/DA (B)、HVA/DA (C)、5-HIAA/5-HT (G) の比率は、PTP と欠損マウス脳の数領域において野生型マウスと比べて著しく低下した。NE 含量は、PTP と欠損マウスにおいて野生型マウスと比べて上昇していた。

(DA 神経系の免疫組織学的解析)

次に DA 神経細胞のマーカー酵素となるチロシンヒドロキシラーゼに対する特異抗体を用いて、PTP と欠損マウスの DA 神経系に組織学的な変化が生じていないか免疫組織学的に解析した (方法、A-5)。結果を図 3 に示す。野生型マウス (+/+, 左側) 及び PTP と欠損マウス (-/-, 右側) における黒質及び腹側被蓋領域 (低倍率写真、a 及び b、高倍率写真、c 及び d) を通る部分、及び striatum (e 及び f) を、チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 特異的ポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学な分析結果によると、PTP と欠損マウスと野生型マウスの DA 神経系に有意な相異は同定されず、PTP と欠損後も DA 神経系は免疫組織学的に正常であると判断された。なお、図中の縮尺バーは、500 µm (a、b、e、及び f)、並びに 50 µm (c 及び d) を示す。

(覚醒剤に対する感受性の低下)

覚醒剤であるメタンフェタミン (M E T H) は、D A 神経系に働いてマウスの運動量を著しく増加させる。P T P と欠損マウスのD A 神経系が機能的に変化している可能性を予想して、M E T H に対する感受性を電磁場方式の運動量測定装置を用いて解析した (前記方法 A - 3)。結果を図 4 に示す。マウスを、アクリルチャンバーに配置し、電磁気センサー計数により運動量を測定した。薬物投与前において P T P と $-/-$ マウス (n = 9) 及び P T P と $+/+$ マウス (n = 9) は、同じ時間経過における自発運動で示した。十分に慣れさせた後 (少なくとも 90 分間)、メタンフェタミン (M E T H、1 m g / k g, s. c.) 又は食塩水 (矢印点) の注射により、野生型マウスと比べ P T P と $-/-$ マウスが著しく弱い自発運動応答を示すことが明らかとなった (図 4 A)。コントロールの生理食塩水投与群に変化は認められなかった。データは、20 分間隔毎の平均値 \pm S E M として示されている (表現型に対し $p < 0.001$)。

また、自発運動における M E T H (1 m g / k g, s. c.)、G B R 1 2 9 0 9 (2 m g / k g, i. p.)、アポモルヒネ (2 m g / k g, s. c.)、p - クロロアンフェタミン (2 m g / k g, i. p.) 及び食塩水の作用を、薬物投与後 60 分間隔の運動量の総カウント数として図 4 B に示す。自発運動測定は、上記と同様に行った。図中のデータは、平均値 \pm S E M として示されている (* $p < 0.05$ 、** < 0.01)。

P T P と欠損マウスは D A T の特異的な阻害剤である G B R 1 2 9 0 9 に対しても同様に低感受性であった (図 4 B)。一方、D A レセプターの非特異的アゴニストであるアポモルヒネは、ポスト側の神経細胞を刺激して同様の効果を発揮するが、アポモルヒネに対する応答性は正常であった (図 4 B)。以上の結果からは P T P と欠損マウスの D A 神経系ではプレ側の神経伝達機能が異常になっていることが示唆される。P T P と欠損マウスは、プレ側シナプスから 5 - H T を遊離させる p - クロロ

アンフェタミンに対しても低感受性を示した（図 4 B）。

- 5 $[^3\text{H}]$ DA を線条体シナプトソームと混合して組織内への $[^3\text{H}]$ DA 取り込み量を測定した（前記方法 A-6-1）。線条体シナプトソームのホモジネートを $[^3\text{H}]$ DA 存在下（1～10 nM）30℃で2分間インキュベートした。Eadie-Hofstee プロットにより DA 摂取量を分析し、最高速度（ V_{max} 、pmol/2分間/mgタンパク質）及び親和性（ K_m 、nM）を、3回の測定値の平均値±SEMを表1に示す（* $P < 0.05$ ）。表1から、DA取り込み量の、最大速度（ V_{max} ）、親和性（ K_m ）、いずれも動力学的に変化していることが判明したが、DA
- 10 ATの数に変化は認められなかった。

表 1

マウス	[^3H]DA アップテーク	
	K_m (nM)	V_{max} (pmol/3min/mg)
PTP $\zeta^{+/+}$	109.2±2.45	45.74±2.77
PTP $\zeta^{-/-}$	147.3±11.3	58.70±1.03

（側坐核における DA 神経伝達の異常）

- 15 METHやGBR12909投与による自発運動の賦活効果は、主に側坐核（NAC）で細胞外DA濃度が増加することにより誘導される。METH投与後の側坐核の細胞外DA濃度の変化をマイクロダイアリシス法によって解析した（前記方法A-4-2）。NACにおけるMETH誘導DA放出を、マイクロダイアリシスにより分析した結果を図5Aに示す。各値は、PTP $\zeta^{+/+}$ マウス（ $n=7$ ）及びPTP $\zeta^{-/-}$ マウス
- 20 （ $n=6$ ）の平均値±SEMであり、METH刺激する前の2サンプルの平均をパーセントとして示している。野生型マウスと比べ（表現型に対し $p < 0.001$ ）PTP ζ 欠損マウスは、METH（1mg/kg, s.c.）投与により起こるDA放出の著しい減少を示した。野生型マウスの側坐核の細胞外DAは、METH（1mg/kg, s.c.）の投与

により明瞭に増加していたが、一方、P T P と欠損マウスでは、M E T H 刺激による細胞外 D A 亢進応答が野生型に比べて明らかに減弱していた (図 5 A)。

この細胞外 D A 濃度に対応して、M E T H 投与後の自発運動は P T P と欠損マウスで低下していることが確認された。図 5 B に、自由に移動している動物の運動量の赤外線モニター装置を用いた分析により、M E T H 刺激後、野生型マウスと比べ P T P と -/- マウスが統計的に低い M E T H 誘導運動を示すことが確認された結果を示す (* $p < 0.05$)。すなわち、覚醒剤に対する低応答性の原因は、前側シナプスからの D A 放出・取り込み過程にあることが同定された。一方、側坐核に挿入したマイクロ透析プローブを通じて 100 mM KCl 溶液を局所投与し脱分極を起こさせることによってシナプス小胞ドパミン D A 遊離を誘導した場合、P T P と欠損マウスの D A 遊離応答は野生型マウスと同等のレベルで成立していた (図 5 C)。加えて、定常状態における細胞外 D A 濃度も変化していないことから (図 5 D)、P T P とは D A シナプス小胞の放出機構自体には必須でないことが示された。

(D A 神経系における P T P との役割)

D A 神経系における P T P との役割を知る上で、P T P との発現領域を明らかにすることは非常に重要である。成熟脳における P T P との詳細な発現パターンは判っておらず、今回、P T P と遺伝子のレポーター遺伝子である L a c Z 遺伝子の発現パターンから本分子の発現領域の同定を行った。すなわち、X-gal で青く染色される細胞は P T P との発現細胞と同定される。成体マウスの D A サーキットにおいて P T P とプロモーター活性を示す細胞の局所分布を、成体ヘテロ接合マウスにおいて X-gal 染色 (青色シグナル)、次いで T H 染色 (茶色シグナル) により調べた結果を図 6 A, B に示す。D A 神経系の起始核である黒質 (S

N) や腹側被蓋 (VTA) には、多くの陽性細胞が認められたが、一方、DA 神経の主要な投射領域である線条体 (ST) や側坐核 (NAC) には検出されなかった。この結果は PTP と欠損によって DA 神経系のプレ側に機能的変化が同定された薬理学的な解析結果と一致している。

- 5 次に、PTP とが DA 神経細胞で直接機能している可能性を確かめるために、シングルセルから調製した RNA を鋳型にした RT-PCR 解析であるシングルセル RT-PCR 法による解析を試みた (前記方法 A-7 及び A-8)。マウス脳由来の cDNA を鋳型としたシングルセル RT-PCR を行い、アガロースゲル電気泳動により分析し、臭化エチジウムで染色した結果を図 6 C の上段に示す。PTP とのホスファターゼ D1 領域、更にマーカー遺伝子、チロシンヒドロキラーゼ (TH、ドパミン神経細胞マーカー)、グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD67, GABA 神経細胞マーカー) 及び Glial fibrillary acidic protein (GFAP、アステログリア細胞マーカー) の PCR 産物が、その mRNA の塩基配列から予想される位置、すなわち PTP と (189)、TH (377)、GAD67 (702) 及び GFAP (517) にそれぞれ検出された。これらの PCR 産物の正当性はクローニング後、DNA シークエンスによって確認した。プライマーはイントロンを挟むように設定してあるのでゲノム DNA 由来の PCR 増幅はおこらない。また、逆転写酵素を加えないコントロールでは PCR 増幅は認められなかった。図 6 C の下段は、TH 陽性 (DA 細胞) と GAD 陽性 (GABA 細胞) と同定された代表例を示している。マウス 4 匹分の黒質及び腹側被蓋から 46 個の細胞を採取・解析した結果、TH 陽性のドパミン神経細胞 28 個及び GAD67 陽性の GABA 神経細胞 6 個が同定された。この際、TH もしくは GAD のどちらも増幅しない 8 例、GFAP の増幅が認められた 4 例は解析から除外している。PTP との PCR 産物は 83% の DA 細胞に

において増幅が認められた（図 6 D）。すなわち、マウス成熟脳においては、ほとんどの DA 神経細胞において蛋白チロシン脱リン酸化の活性を有したレセプター型 P T P ⅰが発現していることが証明された。

（強制遊泳ストレスに対する応答性の変化）

- 5 DA 及び 5 - H T 神経系は、自発運動だけでなく情動やストレス応答に関係することが知られている。強制遊泳ストレス試験では、逃げられない状況下の狭いプールにマウスを投入して、その泳動時間を経時的に評価・解析した（前記方法方法 A - 2 - 3）。すなわち、動物は当初、ストレス刺激から逃れようと盛んに泳ぐが、逃避不可能な状況に対して絶
- 10 望し、次第に無動状態になると考えられている。初日の 1 5 分間の試験はうつ状態を誘導するために行う実験である。このテストにおいて、欠損マウスと野生型マウスの泳動時間に有意な違いは認められない（図 7 A）。しかし、2 4 時間後のテストにおいては、P T P ⅰ欠損マウスは野生型よりも長い時間泳ぎ回っていることが示された（図 7 B）。1 5 分間のテスト中、マウスの運動量は徐々に減少し、最後 1 0 分間中の運動レ
- 15 ベルは、野生型コントロール（n = 8）と比べ P T P ⅰ欠損マウス（n = 8）において有意に高かった。すなわち、P T P ⅰ欠損マウスはストレス刺激に対して慣れにくいことが判った。

- 次に情動行動、特に不安の評価法として一般的な高架式十字迷路試験
- 20 を行った（前記方法 A - 2 - 4）。本テストでは、マウスは明るいと不安になるため明路を避けようとするが、同時にこの場所を探索したいという葛藤的な条件にさらされている。すなわち、不安になりやすい動物は明路を避けて暗路に長く滞在するようになる。一方、探索意欲が強いマウスでは、探索行動が増加し明路 - 暗路への出入りが増加する。P T P ⅰ
- 25 欠損マウス（n = 9）及び野生型コントロール（n = 1 2）の間で高架迷路における挙動に明らかな差異は見られなかった（図 7 C）。さらに、

探検挙動測定値である迷路のアーム部に入った総回数においても、2表現型間で差異は見られなかった（図7D）。これらの2つの因子、明路－暗路の滞在時間（不安行動）及び全入路回数（探索行動）はどちらのマウスも同等と評価された。

5 （新規物体に対する探索行動の変化）

初めて見る対象物に対する探索行動を調べた（前記方法A－2－5）。結果を図8に示す。PTPと欠損マウス（PTPと $-/-$ 、 $n=9$ ）及び野生型コントロール（PTPと $+/+$ 、 $n=9$ ）について、オープンフィールド全域（図8A）及び、オープンフィールド中央領域（図8B）における移動度を各3分毎の平均値±標準誤差で示す（* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ ）。測定1回目（Trial.1）では、最初の9分間はフィールド内には何も置かれていない。この環境下では、両マウスとも中央領域内にはほとんど滞在していないことがわかる。続いて、積み木（初めて見る物体）をフィールド中央に置くと、マウスは積み木に対する探索行動をとり、中央領域への侵入・退出頻度が著しく増加する。全体的な移動度もそれに伴い増加した。また、グラフからは、積み木に対する探索行動は時間経過とともに減少していることが示された。両マウスを比較すると、積み木を置いた中央領域での最初の3分間の移動量は、PTPと $-/-$ マウスが野生型マウスの2倍以上高値であり、6分間まで有意に高値を維持した。24時間後、同条件の2回目の試行（Trial.2）を行った。野生型マウス（PTPと $+/+$ ）は、移動量がほとんど増加しないことから、もはや積み木に対する探索行動していないと判断されるが、PTPと $-/-$ マウスでは、同様に探索行動によると考えられる移動度の亢進が示された。さらに3回目の試行（Trial.3）を行ったところ、両マウスに有意な差異は認められなくなった。以上の結果より、PTPと $-/-$ マウスは、新しい環境に対する慣れが遅延していることが示された。

実施例 2（ピロリ菌毒素 V a c A による胃潰瘍形成における P T P との役割）

ヘリコバクターピロリ菌による胃潰瘍形成における P T P との役割、特に胃における P T P との免疫組織学的同定、ヘリコバクター・ピロリ菌が分泌する細胞外毒素 V a c A の受容体として P T P とが実際に胃潰瘍形成に関与していること、また、その陰性コントロールとしての P T P と欠損マウスの有用性について検討した。

実施例 2 - 1 [方法]

（B - 1 マウスの胃における P T P との免疫組織化学染色）

- 10 ホルマリン固定及びパラフィン包埋した野生型及び P T P と欠損マウスの胃組織切片を、P T P との細胞外領域を認識する抗 6 B 4 プロテオグリカンポリクローナル抗体で免疫染色した。組織切片をキシレン中で脱パラフィン化し、エタノール系列中で脱水した。前記切片を、リン酸緩衝食塩水（P B S、p H 7. 6）で洗浄し、1 0 m M クエン酸バッファ
- 15 ー（p H 6. 0）中で 1 5 分間マイクロ波をかけた。0. 3 % 過酸化水素を用い、脱パラフィン化切片を 1 0 分間インキュベートし、内在性ペルオキシダーゼをブロックした後、P B S 中で洗浄した。その後、前記切片をウシ血清アルブミンで 1 0 分間ブロックし、P B S で洗浄した。処理済み組織切片を、キャリアタンパク質及び 1 5 m M アジ化ナトリ
- 20 ウムを含む 4 ℃ の Tris-HCl バッファー中、抗 6 B 4 プロテオグリカンポリクローナル抗体（1 : 2 0 0 0）で一晩インキュベートした。P B S で洗浄後、製造者説明書に基づき D A B 及び H₂O₂ を基質として D A K O Envision System（DAKO Corp.）で特異抗体結合を調べた。前記切片を、ヘマトキシリンでわずかに対比染色した。
- 25 （B - 2 マウスの胃における P T P との R T - P C R 及びウエスタンブロット）

マウスの胃における P T P との R T - P C R は以下の方法で行った。
マウス胃組織からの R N A 抽出には、T R I z o l Reagent
(Invitrogen) を用い、c D N A の合成には、TrueScriptII Reverse
Transcriptase kit (サワデーテクノロジー) と oligo dT primer (dT)
5 30 を用いた。1 0 n g の R N A 由来の c D N A を鋳型として、1 0 p m
o l のプライマー、0 . 5 U の EX-Taq polymerase (宝酒造株式会社)
及び EX-Taq polymerase 付属の反応バッファー類で計 2 0 μ l で P C
R 反応を行った。P C R 反応では、9 4 $^{\circ}$ C 5 分間を 1 サイクル、9 5 $^{\circ}$ C
3 0 秒、6 2 $^{\circ}$ C 3 秒、7 2 $^{\circ}$ C 2 分間を 3 5 サイクル、最後に、7 2 $^{\circ}$ C 5
10 分間を 1 サイクル行った。さらに、P C R 増幅産物の配列の正当性は、
D N A シークエンスを調べることを行って確認した。P T P とのそれぞ
れのアイソフォームに対する P C R 領域は P T P と - A タイプ (ヌクレ
オチド番号 4 8 6 1 - 5 4 9 9)。P T P と - B タイプ (2 3 2 1 - 2 8
7 5)。P T P と - S タイプ (4 9 1 3 - 5 7 0 4) である。

15 マウスの胃における P T P との検出のためのウエスタンブロットは以
下の方法で行った。胃組織を 1 % N P - 4 0 とタンパク分解酵素阻害剤
を含む T r i s バッファーで懸濁・抽出を行い、その抽出物の遠心分離
上清に、コンドロイチナーゼ A B C を添加、又は無添加で 3 7 $^{\circ}$ C で 1 時
間静置した。さらにタンパクは、S D S - P A G E (6 % アクリルアミ
20 ドゲル) により分離、セミドライ方式で P V D F 膜に転写した。また、
免疫染色にはウサギ抗 6 B 4 ポリクローナル抗体 (1 μ g / m l) と、
ペルオキシダーゼ標識した抗ウサギ抗体を 2 次抗体として用い、P T P
との検出を行った。反応基質には、E C L Plus reagent (アマシャムフ
アルマシア) を用いた。

25 (B - 3 ピロリ菌毒素 V a c A による胃潰瘍形成)

4 週齢のマウス (メス) を 2 4 時間絶食させた後 (飲水は自由)、ピロ

リ菌毒素 V a c A 又は生理食塩水をゾンデによって経口的に投与した。

48 時間後に胃標本を作製して、実体顕微鏡下で胃内部の表面を観察した後、ヘマトキシレン・エオジン染色法によって病理標本を作製・解析した。

5 (B-4 V a c A による胃潰瘍形成の病理評価)

V a c A による胃潰瘍形成の病理評価については、胃粘膜障害スコア (E D S) の評価 (1 = 障害なし。2 = 上皮カラム構造の乱れ。3 = 微小領域でのびらん形成及び上皮細胞の剥離。4 = 浸食性の障害、基底膜の露出及び潰瘍形成。) を行った。また、炎症スコア (I S) の評価

10 (1 = 炎症細胞浸潤なし、2 = 胃腺管の間 (lamina propria) と粘膜下層における散発的な単核球の浸潤、3 = lamina propria の上皮層への浸潤細胞の明瞭な増加、4 = lamina propria への著しい細胞浸潤。) についても行った。

15 (B-5 A Z-521 細胞における P T P の基質分子 G I T 1 のリン酸化レベル及び細胞空胞化の解析)

A Z-521 細胞における P T P の基質分子 G I T 1 (G protein-coupled receptor kinase-interactor 1) (PNAS, 98,6593-6589, 2001) のリン酸化レベル及び細胞空胞化の解析をするために、以下のニュートラルレッドの取り込み、及び免疫沈降法を行った。まず、V a c A 高感受性のヒト胃由来の癌化細胞株 A Z-521 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク) を用いて、細胞密度が $350,000 / \text{cm}^2$ となるようにプレートに接種し、24 時間培養後に酸活性化処理した V a c A を $100 \text{ ng} / \text{ml}$ の E G F と共に添加した。刺激 30 分後、細胞空胞化 (ニュートラルレッド取り込み) 及び G I T 1 のチロシンリン酸化レベル (免疫沈降法) を解析した。

25

ニュートラルレッドの色素取り込み試験は以下の方法で行った。培地

成分を除いた後、0.05%のニュートラルレッドと0.5%のBSAを含むリン酸バッファーを添加して、5分間細胞に取り込ませた。そして0.5%のBSAを含むリン酸バッファーで細胞を3度洗浄した後、細胞内に取り込まれた色素を0.05%の塩酸を含む70%エタノールで抽出し、吸光度(540nm)を測定した。

次にGIT1のチロシンリン酸化試験は以下の方法で行った。1.9×10⁶個の細胞に、300μlの溶解バッファー(20mM Tris-HCl、pH8.0、137mM NaCl、1%NP-40、1mM phenylmethylsulfonyl fluoride、10μg/ml pepstatinA、1mM sodium orthovanadate、及び1mM NaF)を加え、氷上で30分間放置した。この抽出物を遠心分離後、上清のタンパク濃度を100μg/mlに調整した。25μgのサンプルを、25μlのProtein G Sepharose 4FF (Amersham Pharmacia)と2時間混合し、ゲルと非特異的吸着する成分を除去した上清を調整した。この上清に2μlのウサギ抗GIT1抗血清を加え、1時間の反応後、25μlのProtein G Sepharose 4FFを添加し、さらに3時間の反応を行った。反応後のビーズは、溶解バッファーで3回洗浄した後、特異的に吸着している成分をSDS-PAGEのサンプルバッファーで抽出した。このサンプルをSDS-PAGEにより分離後、セミドライ方式でPVDF膜に転写し免疫沈降に用いた。なお、GIT1のチロシンリン酸化の検出には、抗チロシンリン酸化マウスモノクローナル抗体PY20を用い、GIT1の検出には、ヤギ抗GIT1抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz)を用いた。

実施例2-2 [結果]

(マウス胃上皮細胞層におけるPTPの発現)

PTPの細胞外ドメインを特異的に認識する、ウサギポリクローナ

ル抗体を用いて、マウス胃上皮細胞層に P T P とが発現しているかどうかを調べた結果を図 9（参考資料 3 参照）に示す。野生型マウス（図 9 A）及び P T P と欠損マウス（図 9 B）からもわかるように、野生型マウスの胃上皮細胞層に P T P とが発現していることが始めて明らかになった。元来、P T P とは中枢神経系のみで発現しているとされていたが、胃での発現は脳に比べて非常に低レベルでバックグラウンドとの識別ができなかったためと思われる。本発明では、P T P と欠損マウスを陰性コントロールとして用いた結果、非常に高感度な免疫染色の条件を設定することができた。

10 （マウス胃上皮細胞層における P T P とアイソフォームの発現）

R T - P C R の結果から、胃組織において P T P と - A タイプ、P T P と - B タイプ、P T P と - S タイプの全てのスプライスバリエントが発現していることが確認された（図 10 A）。一方、ウエスタンブロット解析からは、実際のタンパク成分としては、レセプター型の P T P と - B タイプが主要であること、また、コンドロイチナーゼ A B C 処理によって電気泳動上の移動度が変化しないことから、P T P と - B タイプは、コンドロイチン硫酸修飾を受けていない性状であることが示された（図 10 B）。

（マウス胃表皮における潰瘍の発生）

20 V a c A 投与後 4 8 時間のマウス胃表皮における潰瘍の発生を実体顕微鏡を用いて調べた。結果を図 11 に示す。V a c A を投与した野生型マウスの胃には 7 匹中 3 匹において顕著な潰瘍状の障害が認められ（矢印部分、図 11 A）、残り 4 匹についても程度は軽いが、びらん形成や胃表層に明瞭な脱落が認められた。一方、V a c A を経口投与した P T P と欠損マウスの胃（7 匹）には有意な障害は認められなかった（図 11 B）。V a c A を投与した野生型マウス標本のヘマトキシレン・エオジン

染色の結果では、明らかに潰瘍が形成されており（図 1 1 C 低倍率及び図 1 1 D 高倍率の矢印部分）、ヘリコバクター・ピロリ菌感染によるヒトの病態と非常に酷似している様子が認められたが、一方、PTP と欠損マウスは全く正常であることから（図 1 1 E）、VacA による潰瘍形成に PTP とが必須の役割を担っていることが個体レベルで初めて明らかになった。生理食塩水投与群は野生型マウス（図 1 1 F）及び PTP と欠損マウスはどちらも正常であった。

（マウス胃表皮の潰瘍形成の病理評価）

胃粘膜障害（EDS）及び炎症（IS）の程度を上記（B-4）の方法に従って評価した。EDS 及び IS の平均値±標準誤差を表 2 に示す。野生型マウス（PTP と +/+）においては、VacA 投与用量に依存した胃粘膜障害及び炎症が認められたが、PTP と欠損マウス（PTP と -/-）では、全く異常が認められなかった。なお、表中の#、 $P < 0.05$ ；##、 $P < 0.001$ は、生理食塩水を投与した野生型マウスとの比較、**、 $P < 0.001$ は、VacA（0.5 mg/kg）を投与した野生型マウスとの比較を Mann-Whitney's U test で行った結果である。また、nd の記述は解析を行っていないことを意味する。

表 2

VacA (mg/kg)	n		EDS		IS	
	PTP と +/+	PTP と -/-	PTP と +/+	PTP と -/-	PTP と +/+	PTP と -/-
0	7	7	1.1±0.4	1.3±0.5	1.3±0.5	1.1±0.4
0.125	5	nd	1.8±0.8	nd	1.4±0.9	nd
0.250	5	nd	2.2±0.4 [#]	nd	1.4±0.6	nd
0.500	10	10	3.8±0.4 ^{##}	1.3±0.5 ^{**}	3.6±0.5 ^{##}	1.3±0.5 ^{**}

（AZ-521 細胞における PTP との基質分子 GIT1 のリン酸化レ

ベル及び細胞空胞化の解析)

VacA刺激によるPTPの基質分子GIT1のチロシンリン酸化を調べた結果を図12に示す。VacA高感受性株AZ-521細胞において、VacA刺激によりPTPの基質分子であるGIT1のチロシンリン酸化レベルが用量依存的に減少していること(図12A)、GIT1リン酸化の減少は、細胞へのニュートラルレッドの取り込み(空胞形成の指標)(図12B)と相関関係にあることが示された。VacAの細部毒性は、*in vitro*において細胞空胞化能として評価され、VacAはPTPの活性を亢進させ、GIT1のチロシンリン酸化を低下させることによって空胞形成に関与している可能性が示された。

実施例3 (プレイオトロフィンによる胃潰瘍形成におけるPTPの役割)

プレイオトロフィンは、18 kDのヘパリン結合性分泌タンパク質で、神経栄養因子様活性、神経細胞の接着、突起伸長、血管新生への関与が知られている(BioScience 用語ライブラリー:「サイトカイン・増殖因子」、羊土社、p126-127, 1998)。また、PTPの細胞外領域と結合し(J. Biol. Chem. 271, 21446-21452, 1996)、PTPの活性を変化させることが示されている(PNAS, 97, 2603-2608, 2000)。そこで、プレイオトロフィンが胃潰瘍形成に関与しているかどうかについて調べてみた。

20 実施例3-1 [方法]

プレイオトロフィンによる胃潰瘍形成におけるPTPの役割は以下の方法で調べた。4週齢のマウス(メス)を24時間絶食させて後(飲水は自由)、プレイオトロフィン(ペプチド研究所)をゾンデによって経口投与した。48時間後に胃標本作製して、実体顕微鏡下で胃内部の表面を観察した後、ヘマトキシレン・エオジン染色法により病理標本作製・解析した。

実施例 3 - 2 [結果]

5 プレイオトロフィン投与後、48時間のマウス胃上皮における胃粘膜障害の程度を実体顕微鏡下で調べた。結果を図13に示す。プレイオトロフィンを投与した野生型マウスの胃には、著しい出血が認められた(図13A)。一方、プレイオトロフィンを投与したPTP^{-/-}マウスの胃には障害が認められなかった(図13B)。プレイオトロフィンを投与した野生型マウス標本のヘマトキシレン・エオジン染色の結果、胃上皮に明らかな障害が認められた(図13C)。一方、PTP^{-/-}マウスは全く正常であった(図13D)。以上の結果、PTP^{-/-}とトリガンド分子の結合により潰瘍を惹起することが初めて明らかとなった。プレイオトロフィンの胃潰瘍形成における関与は、これまで全く知られていない知見であり、PTP^{-/-}マウスがプレイオトロフィンによる胃潰瘍形成の陰性コントロールとして非常に有用であることが示された。

15 産業上の利用可能性

本発明により、PTP^{-/-}が中枢モノアミン神経系、特にドパミン神経系で生理学的に重要であることが初めて示され、PTP^{-/-}のチロシンホスファターゼ活性を特異的に調節する薬剤はまだ開発されていないことから、PTP^{-/-}マウスを用いて特異的な薬剤をスクリーニングすることにより、神経性疾患の新規治療薬の開発に繋がる可能性が大きい。

20 また、本発明により、ピロリ菌が分泌する毒素VacAの宿主側受容体として同定されたPTP^{-/-}が実際に胃で発現していることを組織学的に始めて明らかにして、また、ピロリ菌毒素VacAによる胃潰瘍形成にPTP^{-/-}が重大な関与をしていることをマウス個体レベルで明確に示した。

25 これらの結果は、ピロリ菌感染による胃潰瘍の発生メカニズムの解明や新規な胃潰瘍や胃炎の治療薬の開発に繋がる可能性が大きい。

請 求 の 範 囲

1. プロテオグリカン型受容型プロテインチロシンホスファターゼ（P
T P と）をコードする遺伝子D N Aの機能が染色体上で欠損した非ヒト
5 動物と、野生型の非ヒト動物とに、被検物質を投与し、これら非ヒト動
物におけるP T P と活性を比較・評価することを特徴とするP T P と活
性促進又は抑制物質のスクリーニング方法。
2. P T P と活性の比較・評価が、中枢モノアミン神経系の機能の比較・
評価であることを特徴とする請求項1記載のP T P と活性促進又は抑制
10 物質のスクリーニング方法。
3. 中枢モノアミン神経系の機能の比較・評価が、中枢モノアミン代謝
レベルの変化、覚醒剤に対する感受性、中脳－辺縁ドーパミン神経系の
機能的障害の有無、新しい環境に対する慣れの程度、又はストレス応答
性の比較・評価であることを特徴とする請求項2記載のP T P と活性促
15 進又は抑制物質のスクリーニング方法。
4. P T P と活性の比較・評価が、ピロリ菌毒素V a c Aとの結合の程
度の比較・評価であることを特徴とする請求項1記載のP T P と活性促
進又は抑制物質のスクリーニング方法。
5. P T P と活性の比較・評価が、ヘパリン結合性分泌タンパク質プレ
20 イオトロフィンとの結合の程度の比較・評価であることを特徴とする請
求項1記載のP T P と活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法。
6. P T P とをコードする遺伝子D N Aの機能が染色体上で欠損した非
ヒト動物が、4世代以上の戻し交配により純化された非ヒト動物である
ことを特徴とする請求項1～5のいずれか記載のP T P と活性促進又は
25 抑制物質のスクリーニング方法。
7. 非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項1～6のいずれ

か記載の P T P と 活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

8. 請求項 1 ～ 7 のいずれか記載のプロテオグリカン型受容型プロテインチロシンホスファターゼ (P T P と) 活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法によって得られる P T P と 活性促進又は抑制物質。

5 9. P T P と 活性促進又は抑制物質が、 P T P と とピロリ菌毒素 V a c A との間の結合阻害物質である請求項 8 記載の P T P と 活性促進又は抑制物質。

10 10. P T P と 活性促進又は抑制物質が、 P T P と とヘパリン結合性分泌タンパク質プレイオトロフィンとの間の結合阻害物質である請求項 8 記載の P T P と 活性促進又は抑制物質。

11. 請求項 8 記載のプロテオグリカン型受容型プロテインチロシンホスファターゼ (P T P と) 活性促進又は抑制物質を有効成分として含有する中枢モノアミン神経系機能障害の治療薬。

15 12. 請求項 8 又は 9 記載のプロテオグリカン型受容型プロテインチロシンホスファターゼ (P T P と) 活性抑制物質を有効成分として含有するヘリコバクター・ピロリによる胃潰瘍又は胃炎の治療薬。

13. 請求項 8 又は 10 記載のプロテオグリカン型受容型プロテインチロシンホスファターゼ (P T P と) 活性抑制物質を有効成分として含有するプレイオトロフィンによる胃潰瘍又は胃炎の治療薬。

20 14. プロテオグリカン型受容型プロテインチロシンホスファターゼ (P T P と) をコードする遺伝子 D N A の機能が染色体上で欠損した、中枢興奮剤 (依存性薬剤) に対して低感受性の非ヒトモデル動物。

15 15. 覚醒剤に対して低感受性である請求項 14 記載の非ヒトモデル動物。

25 16. P T P と をコードする遺伝子 D N A の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物が、4 世代以上の戻し交配により純化された非ヒト動物であ

ることを特徴とする請求項 1 4 又は 1 5 記載の非ヒトモデル動物。

1 7. 非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項 1 4 ～ 1 6 のいずれか記載の非ヒトモデル動物。

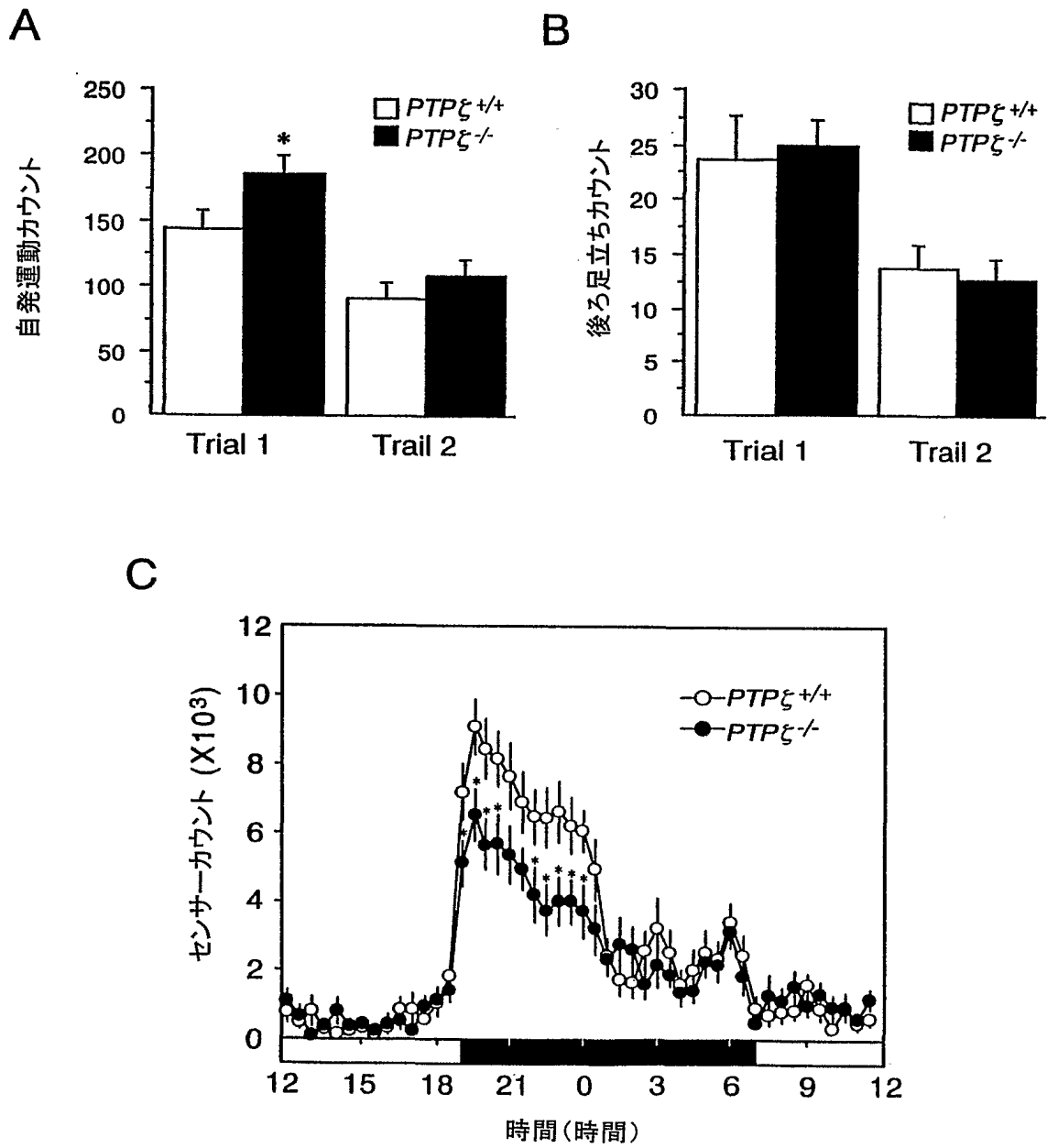
1 8. プロテオグリカン型受容型プロテインチロシンホスファターゼ(P
5 T P ⅴ) をコードする遺伝子 D N A の機能が染色体上で欠損した、ピロリ菌毒素 V a c A に対して低感受性の非ヒトモデル動物。

1 9. プロテオグリカン型受容型プロテインチロシンホスファターゼ(P
T P ⅴ) をコードする遺伝子 D N A の機能が染色体上で欠損した、ヘパ
リン結合性分泌タンパク質プレイオトロフィンに対して低感受性の非ヒ
10 トモデル動物。

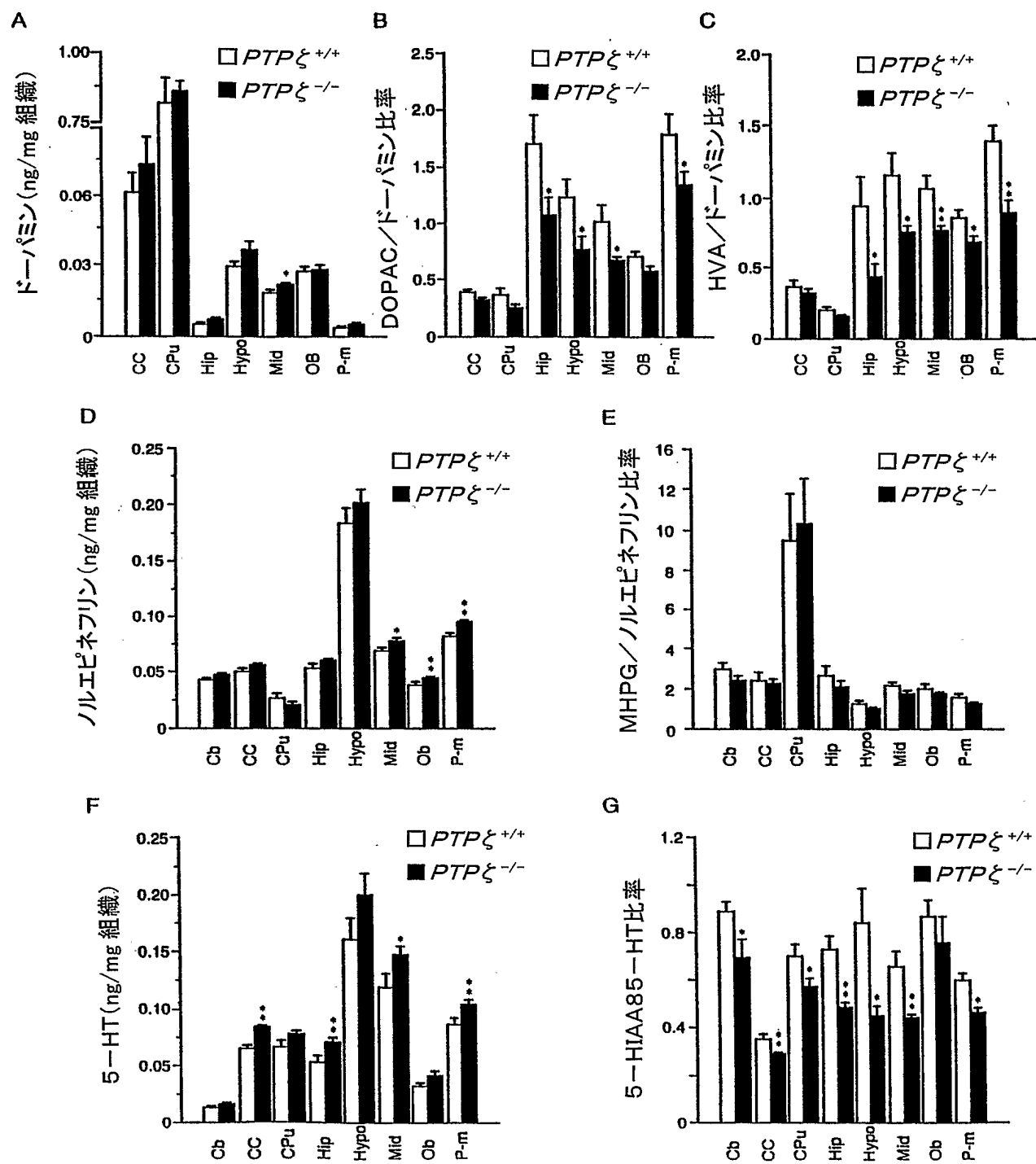
2 0. P T P ⅴをコードする遺伝子 D N A の機能が染色体上で欠損した
非ヒト動物が、4 世代以上の戻し交配により純化された非ヒト動物であ
ることを特徴とする請求項 1 8 又は 1 9 記載の非ヒトモデル動物。

2 1. 非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項 1 8 ～ 2 0 の
15 いずれか記載の非ヒトモデル動物。

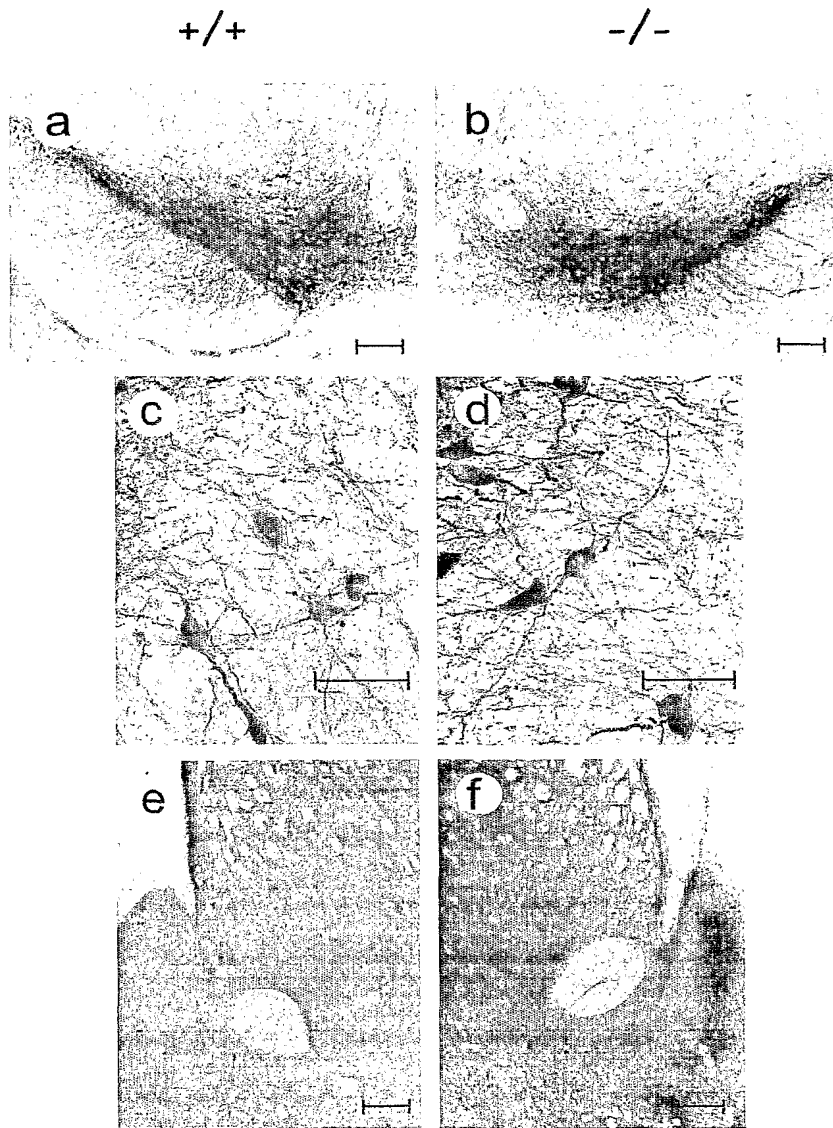
第 1 図



第 2 図

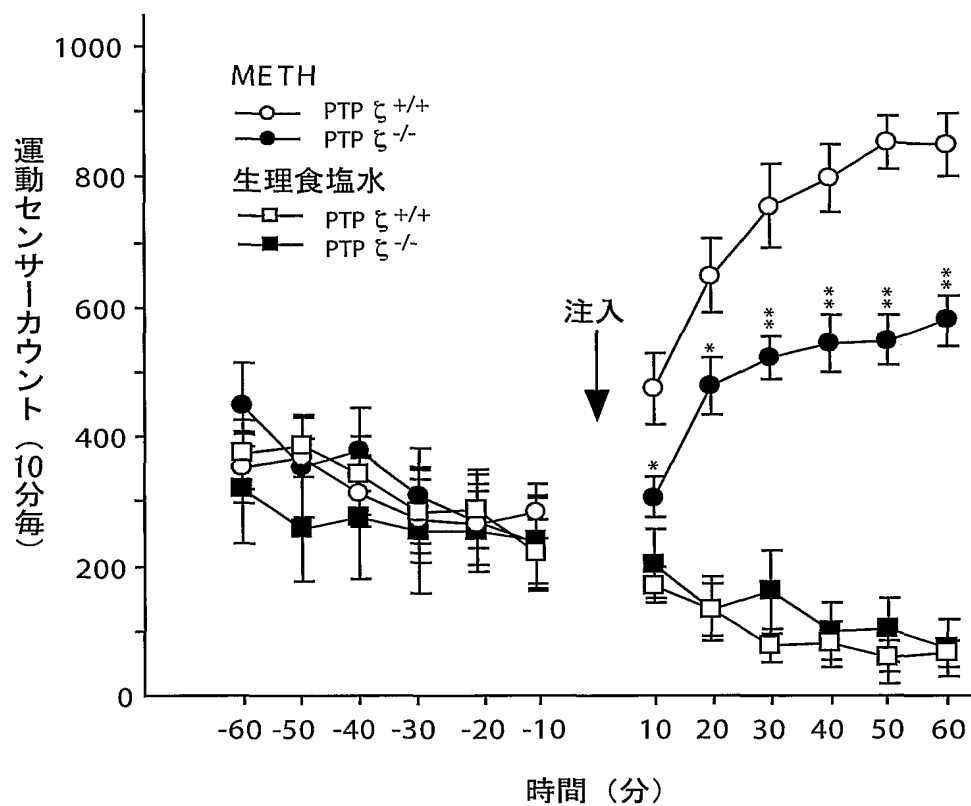


第 3 図

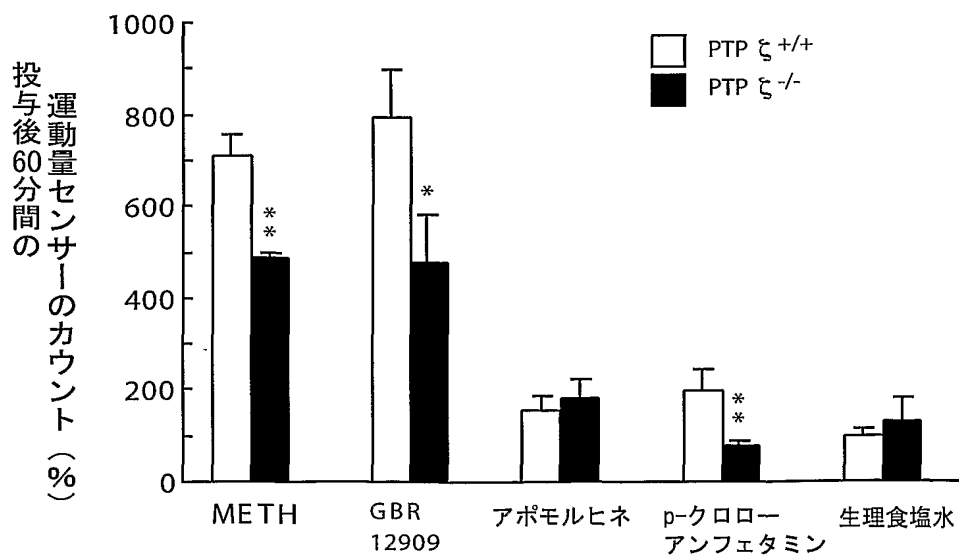


第 4 図

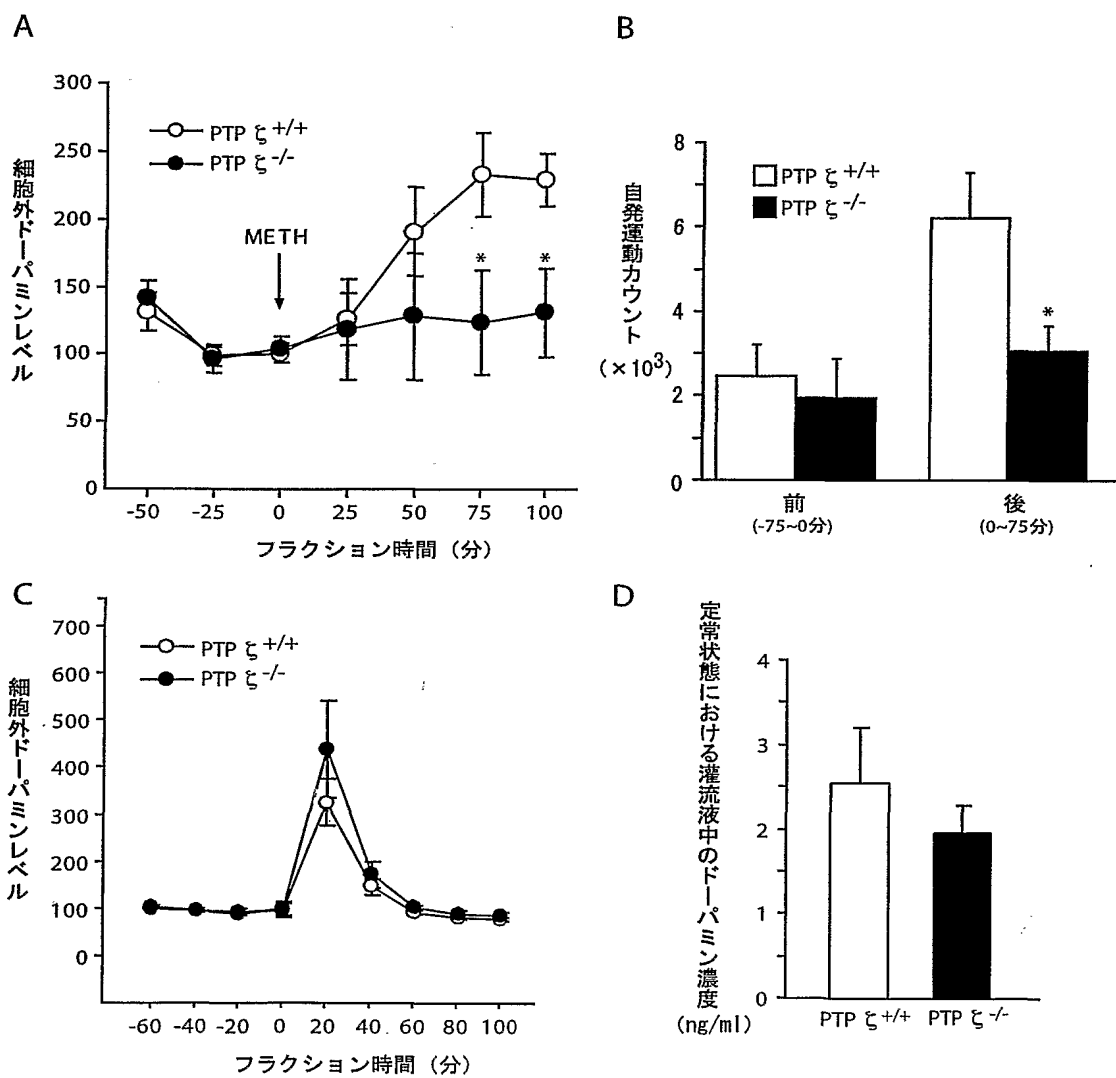
A



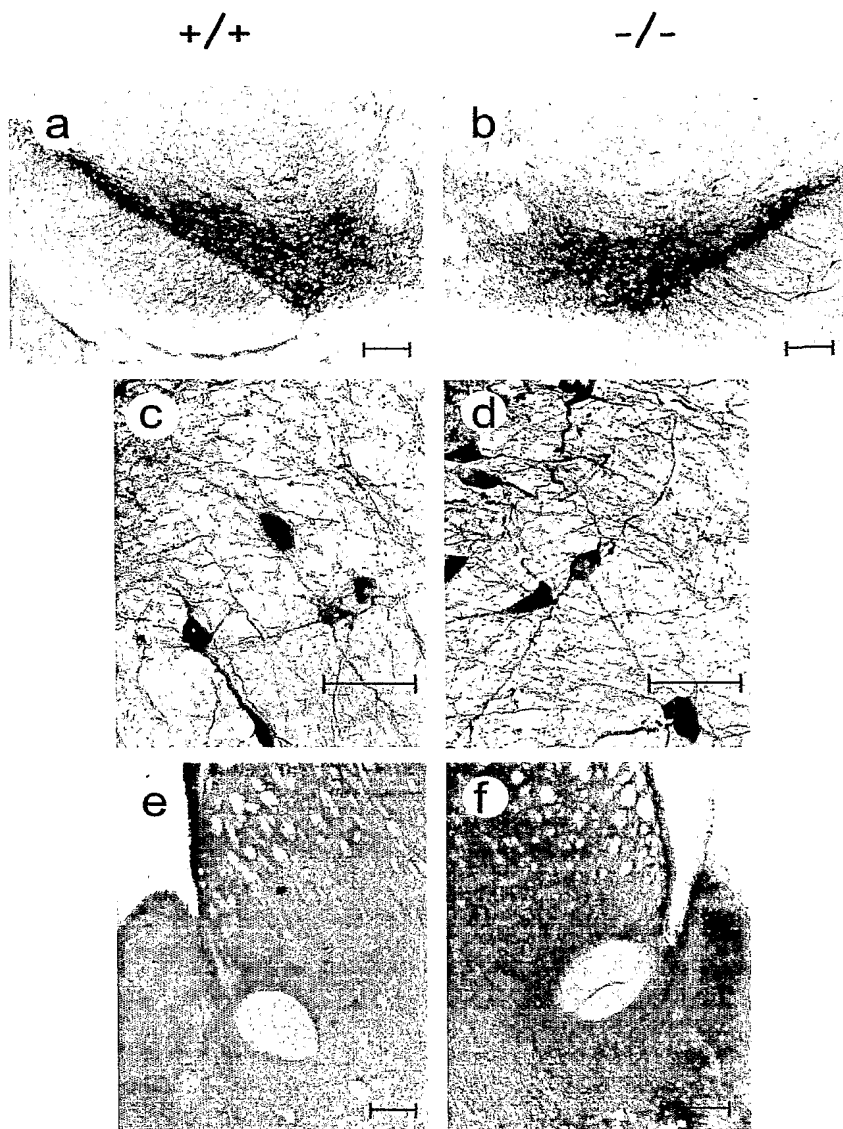
B



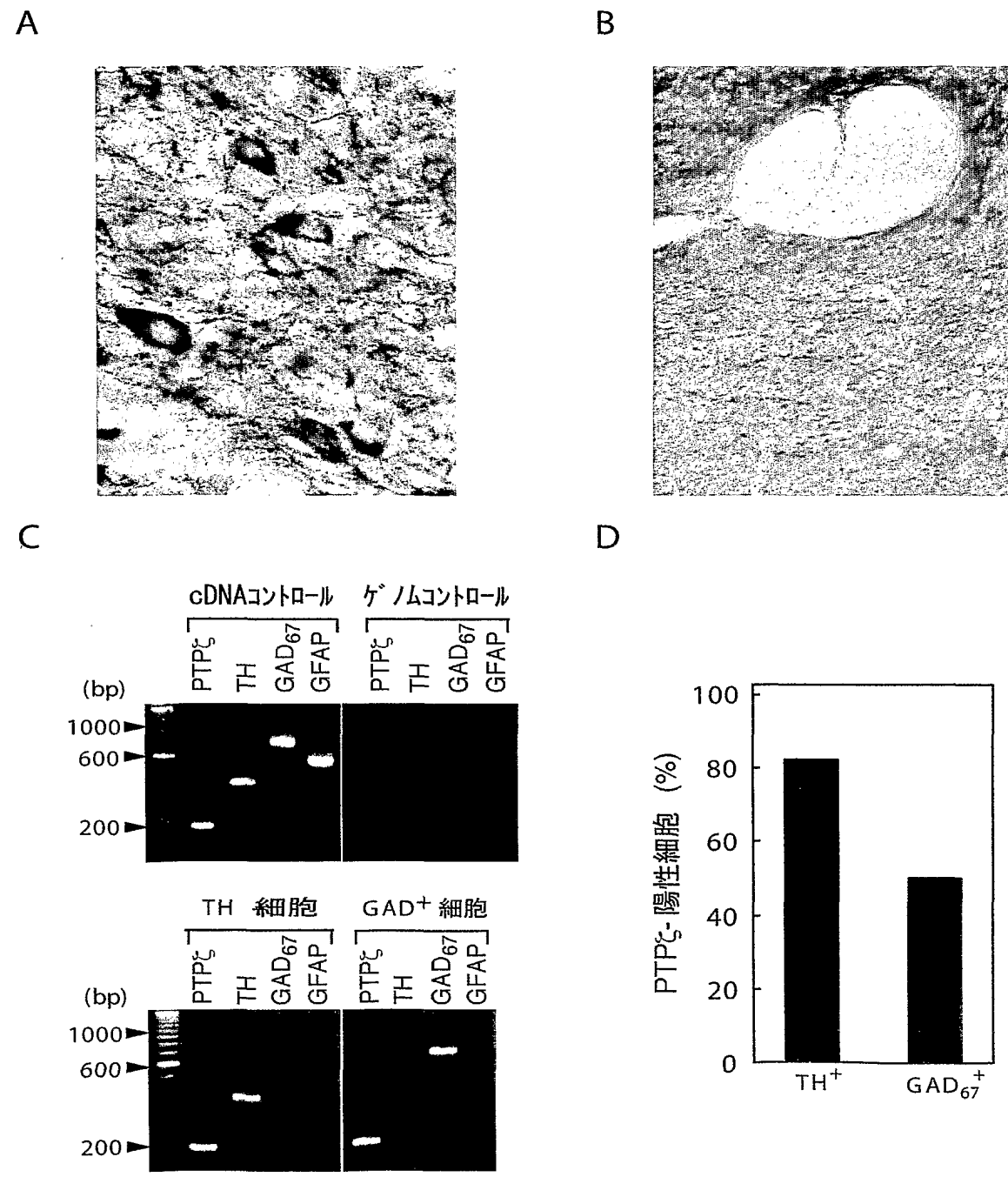
第 5 図



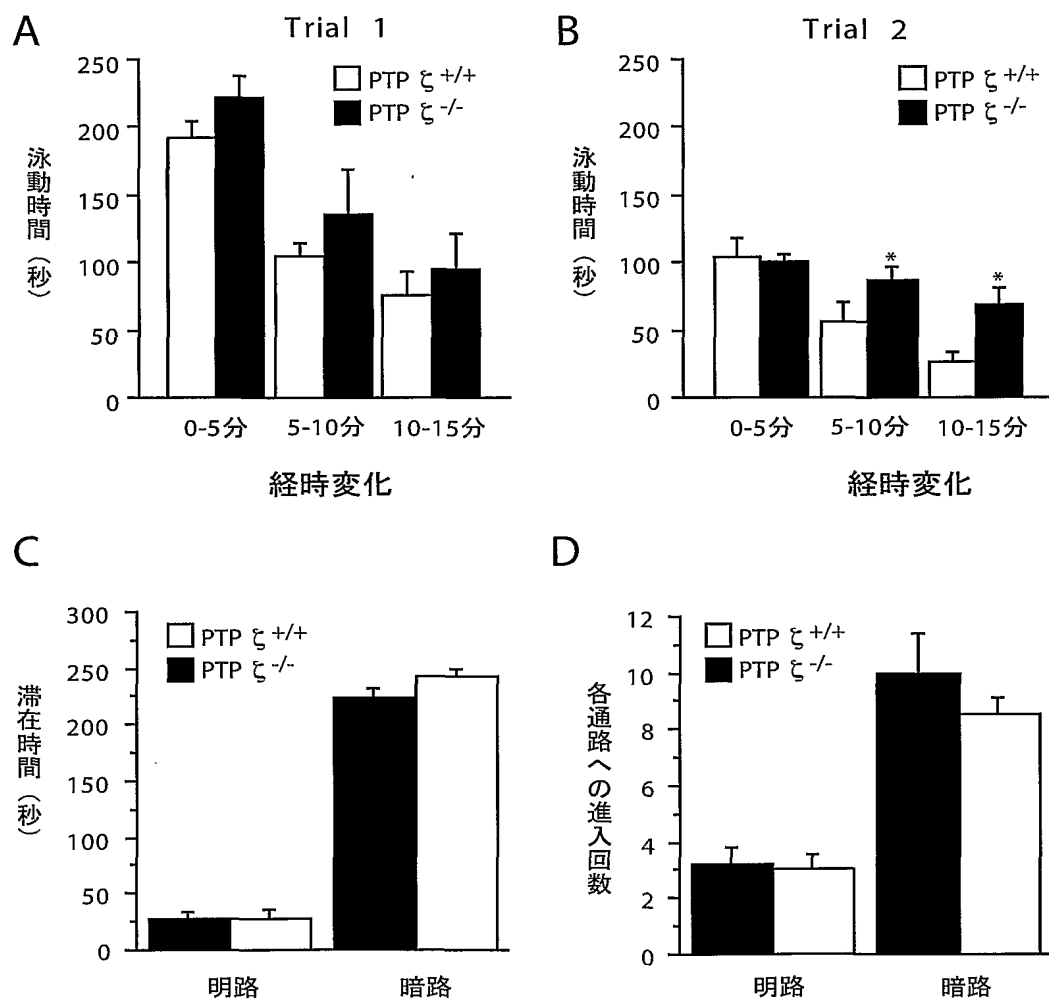
第 3 図



第 6 図

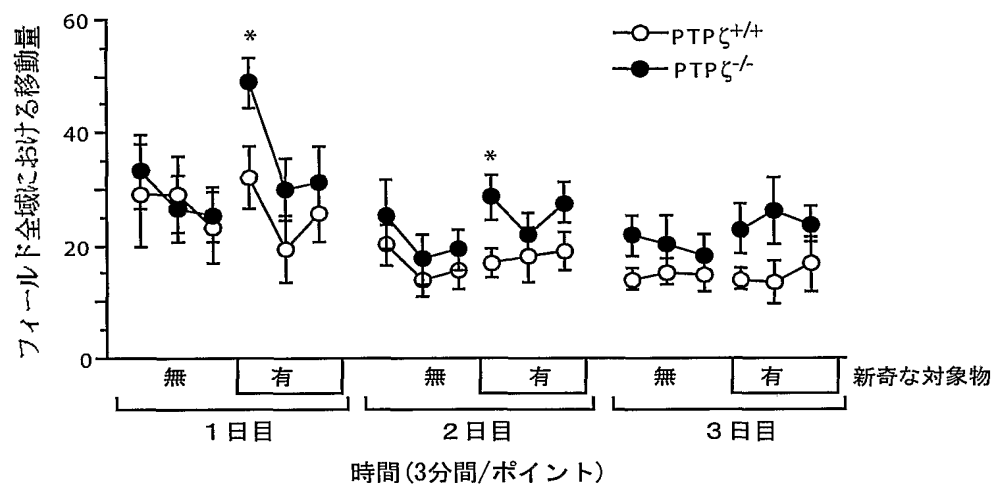


第 7 図

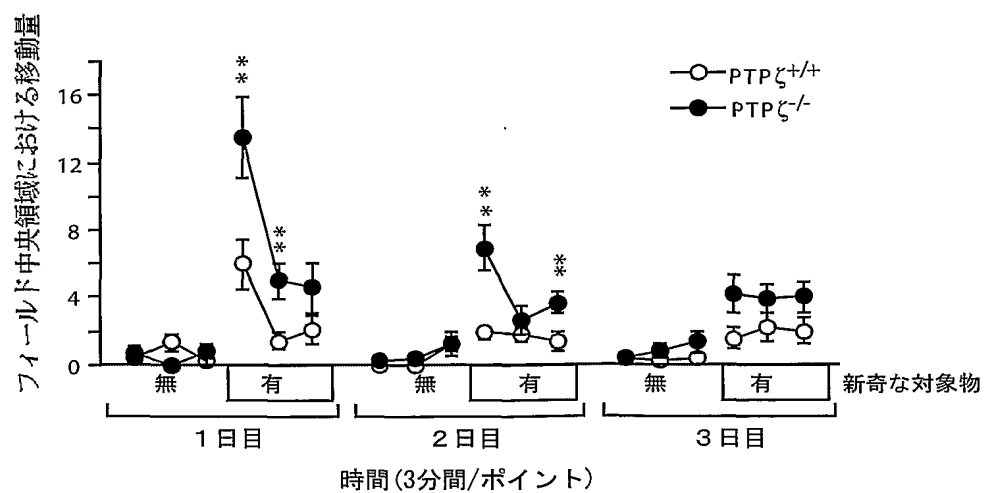


第 8 図

A

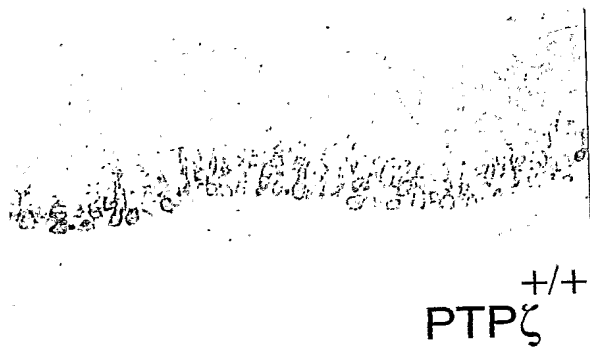


B



第 9 図

A

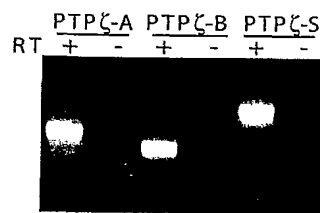


B

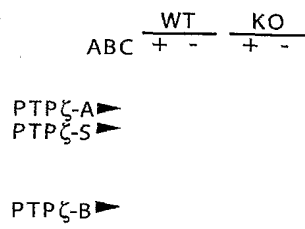
PTP $\zeta^{-/-}$

第 10 図

A



B



第 11 図

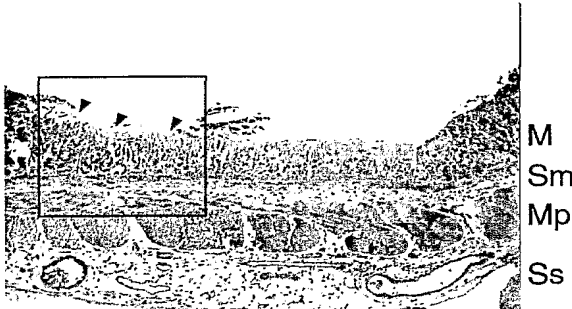
A $VacA/PTP\zeta^{+/+}$



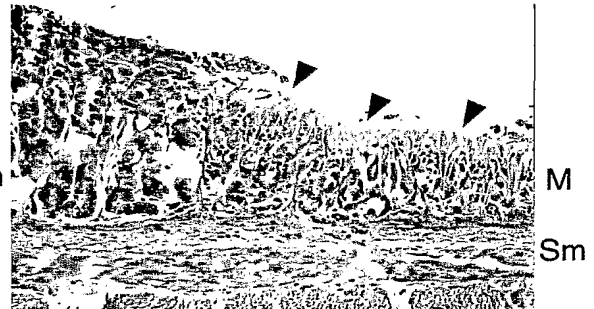
B $VacA/PTP\zeta^{-/-}$



C $VacA/PTP\zeta^{+/+}$



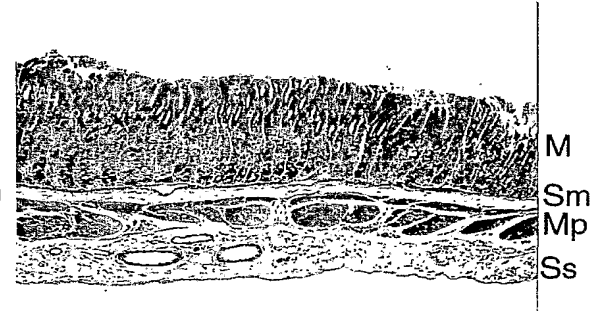
D $VacA/PTP\zeta^{+/+}$



E $VacA/PTP\zeta^{-/-}$

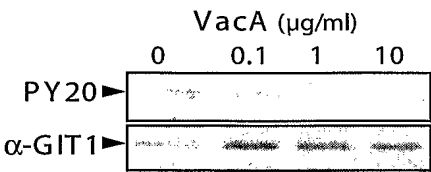


F 生理食塩水/ $PTP\zeta^{+/+}$

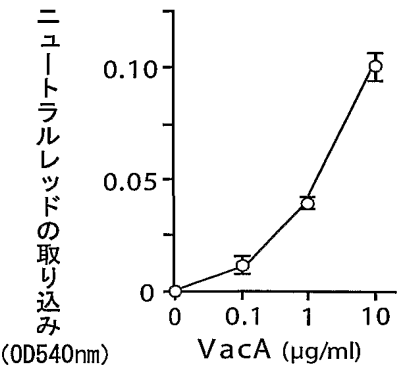


第 1 2 図

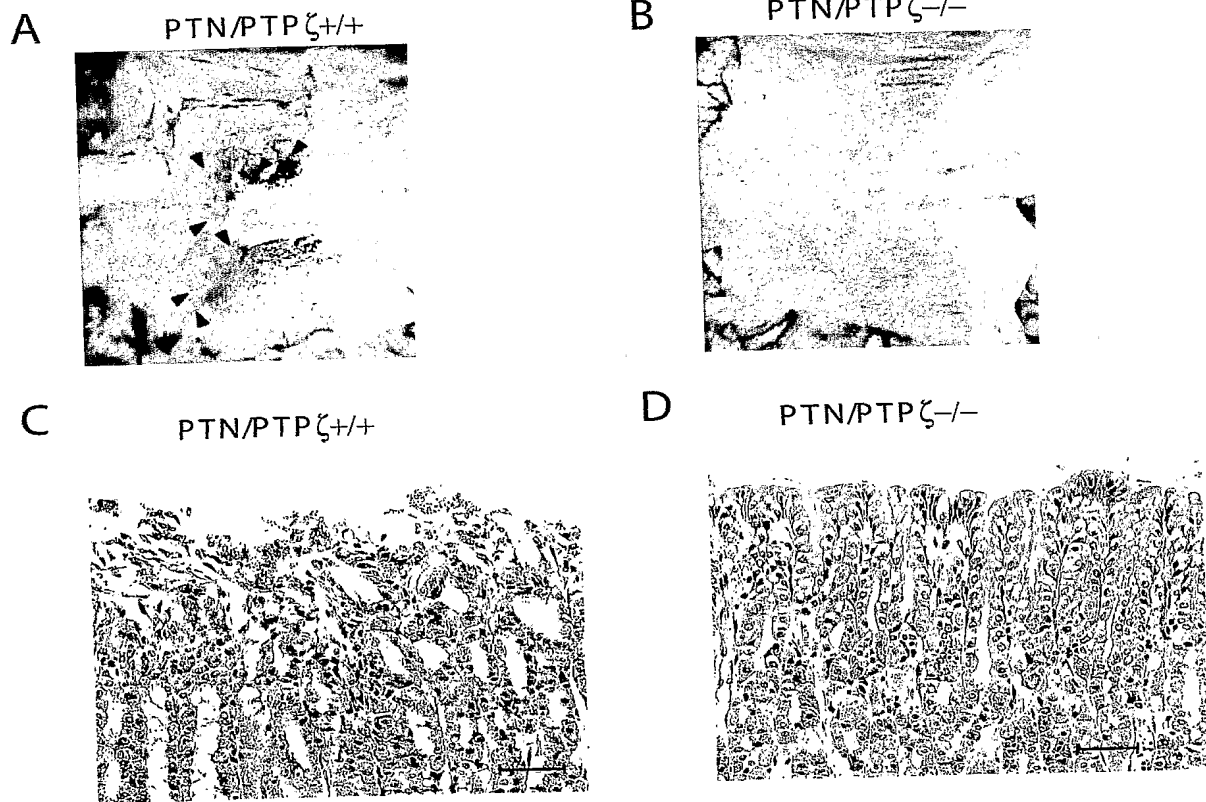
A



B



第 13 図



SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Processes for screening PTP-zeta inhibitor or activator

<130> A011-12PCT

<140>

<141>

<150> JP 2000/223184

<151> 2000-07-24

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Sense Primer

<400> 1

ggtccactga agtccacagc

20

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Antisense
Primer

<400> 2

tctagtacaa tgtatgtgcc cg

22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PTP-zeta Sense
Primer

<400> 3

cgggagcttc ctggtcaacc ag

22

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PTP-zeta
Antisense Primer

<400> 4

agcacgggta gggagtactc

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06343

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, G01N33/50, 33/15, A01K67/027, A61K45/00, A61P25/00, 1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, G01N33/50, 33/15, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Takafumi SHINTANI et al., "Neurons as well as astrocytes express proteoglycan-type protein tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta: analysis of mice in which the PTPzeta/RPTPbeta gene was replaced with the LacZ gene", Neuroscience Letters, (1998), Vol.247, pages 135 to 138	1, 6-7, 14-21 4-5
Y	Kinnosuke YASHIRO et al., "Activation of Helicobacter pylori VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase beta", J. Biol. Chem., (1999), Vol.274, No.51, pages 36693 to 36699	4
Y	Nobuaki MAEDA et al., "6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta, binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM)", J. Biol. Chem., (1996), Vol.271, No.35, pages 21446 to 21452	5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 August, 2001 (06.08.01)Date of mailing of the international search report
21 August, 2001 (21.08.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06343

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Nobuaki MAEDA et al., "A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta", J. Biol. Chem., (1999), Vol.274, No.18, pages 12474 to 12479	1-7, 14-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06343

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 8-13
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning the "PTP ζ activity promoter or inhibitor" as set forth in the above claim, the description merely discloses a screening method but no substance obtained by the screening method. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is completely unknown what particular compounds are involved in the scope thereof. Thus, the above claim is described in an extremely unclear manner. Therefore, no meaningful international search can be practiced on this claim.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, G01N33/50, 33/15, A01K67/027, A61K45/00, A61P25/00, 1/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, G01N33/50, 33/15, A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	Takafumi SHINTANI et al., Neurons as well as astrocytes express proteoglycan-type protein tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta: analysis of mice in which the PTPzeta/RPTPbeta gene was replaced with the LacZ gene, Neuroscience Letters, 1998, Vol. 247, p. 135-138	1, 6-7, 14-21/ 4-5
Y	Kinnosuke YASHIRO et al. Activation of Helicobacter pylori VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase beta, J Biol Chem, 1999, Vol. 274, No. 51, p. 36693-36699	4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.、08.01

国際調査報告の発送日

21.08.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光本 美奈子



4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Nobuaki MAEDA et al., 6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta, binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM), J Biol Chem, 1996, Vol. 271, No. 35, p. 21446-21452	5
A	Nobuaki MAEDA et al., A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta, J Biol Chem, 1999, Vol. 274, No. 18, p. 12474-12479	1-7, 14-21

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 8-13 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
前記請求の範囲の「PTPと活性促進又は抑制物質」について、明細書には、スクリーニング方法が記載されているのみであり、該スクリーニング方法により得られる物質については何ら記載されていない。また、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのようなものが包含されるのか全く不明であるから、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求の範囲について、有意義な国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。